



# **Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures d'HSV-1**

par

Yordanka Yakova

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en Pathologie et Biologie Cellulaire  
option Biologie Cellulaire

juin, 2012

© Yordanka Yakova, 2012



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Importance des protéines cellulaires incorporées dans les  
virions matures d'HSV-1**

Présenté par :  
Yordanka Yakova

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Gregory Emery, président-rapporteur  
Dr. Roger Lippé, directeur de recherche  
Dr. Philippe Roux, membre du jury



## Résumé

Pour compléter leur cycle de vie, les virus interagissent avec de nombreux facteurs de la cellule-hôte. Le virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1) ne fait pas exception. Une récente étude protéomique du virus effectuée par notre laboratoire a permis d'identifier 49 protéines cellulaires potentiellement incorporées dans les virions matures d'HSV-1 [1]. Étant donné que certaines de ces protéines peuvent jouer des rôles importants au cours du cycle de vie du virus, elles constituent des cibles de choix pour identifier et caractériser de nouvelles interactions hôte-pathogène dans le contexte d'HSV-1. D'ailleurs le laboratoire a été effectué un criblage aux petits ARN d'interférence qui a démontré qu'au moins 15 des protéines incorporées sont impliqués dans le cycle de réplication de HSV-1 en culture cellulaire (Annexe 1).

Des nombreuses études rapportent l'incorporation des protéines de l'hôte dans les virions matures mais très peu abordent l'importance de la fraction des protéines cellulaires incorporée dans les virions pour le cycle virale. Pour vérifier ça, nous avons déplété ces protéines des virions matures extracellulaires en utilisant des petits ARN d'interférence. Par la suite, nous avons utilisé ces virus déplétés pour réinfecter des cellules déplétées ou normales. Cette méthode nous a permis d'identifier pour la première fois 8 protéines (DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A, Rab10 et 14-3-3ζ) dont l'absence dans les virions réduit la production virale d'au moins 50%. Pour mieux comprendre à quelle étape du cycle viral ces protéines sont nécessaires, nous avons aussi quantifié les virus intracellulaires, produits des cellules déplétées individuellement des quinze protéines cellulaires. Ainsi, nous avons trouvé que dans nos conditions 7 de ces 8 protéines cellulaires (DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A et Rab10) semblent impliquées dans la production des virus intracellulaires, ce qui nous a stimulés à débiter une série de tests plus approfondis de l'entrée d'HSV-1. Les résultats préliminaires, démontrent l'implication dans l'entrée d'HSV-1 d'au moins 3 à 4 de ces protéines (HSPA8, KRT10, Rab5A et Rab10).

**Mots-clés :** *HSV-1, ARN d'interférence, pARNi, réinfection, protéines cellulaires, virus déplétés, virus intracellulaires, protéines incorporées, entrée.*

## Abstract

To complete their life cycle viruses interact with many factors of the host cell. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is no exception. A recent proteomic study of the virus carried by our laboratory has identified up to 49 cellular proteins potentially incorporated into the mature virions of HSV-1[1]. Since some of these proteins may play important roles during the viral life cycle, they are interesting targets for identification and characterization of new host-pathogen interactions in the context of HSV-1.

To target the proteins that are relevant to the viral life cycle of Herpes, the laboratory performed a screening with small interfering RNAs (siRNAs), which showed that at least 15 incorporated proteins are involved in the replication cycle of HSV- 1 in cell culture (Appendix 1).

Numerous studies report the incorporation of host proteins in mature virions but few addresses the importance for the viral infectivity of the fractions of cellular proteins incorporated into the virions. To verify this, we depleted these proteins from the mature extracellular virions using siRNAs. Subsequently, we used these viruses to re-infect depleted or normal cells. This method allowed us to identify for the first time eight proteins (DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A, Rab10 and 14-3-3ζ) whose absence in virions reduced viral production by at least 50%. As part of understanding at what stage of the life cycle these proteins are necessary for HSV-1, we tested the infectivity of intracellular depleted viruses. Thus, we found at least seven cellular proteins (DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A and Rab10) to have a pronounced effect on the replication of herpes virus, which has stimulated us to begin a series of more in-depth tests of the entry of HSV-1. Preliminary results demonstrate the involvement in the entry of HSV-1 of at least three to four proteins (HSPA8, KRT10, Rab5A and Rab10).

**Keywords:** *HSV-1, RNA interference, siRNA, reinfection, cell proteins, depleted viruses, intracellular virus, incorporated proteins, viral entry.*

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1. Définition et taxonomie.....	1
1.2. Historique.....	1
1.3. Structure d'HSV-1.....	2
1.3.1. Génome viral.....	3
1.3.2. Enveloppe.....	3
1.3.3. Tégument.....	4
1.3.4. Capside.....	5
1.4. Cycle viral.....	5
1.4.1. Entrée du virus dans la cellule hôte.....	6
1.4.2. Transcription des gènes viraux.....	7
1.4.3. Réplication du génome d'HSV-1.....	7
1.4.4. Modèle d'enveloppement d'HSV-1.....	8
1.4.5. Phase de latence.....	9
1.5. Mécanisme d'action des ARN d'interférence et leur application dans les études des interactions hôte-pathogène.....	10
1.6. Incorporation de protéines de l'hôte dans le virus mature.....	11
1.7. Fonctions des quinze protéines cellulaires importantes pour HSV-1. Rôles dans les infections virales.....	14
2. Introduction du projet et objectifs.....	17
3. Matériel et méthodes.....	19
3.1. Lignées cellulaires, virus.....	19
3.2. Anticorps.....	19
3.3. Immunobuvardage de type Western.....	19
3.4. Transfection aux ARNi.....	20
3.5. Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions (Réinfections).....	21
3.6. Essai d'entrée.....	22
3.6.1 Importance des bassins des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures d'HSV-1.....	22
3.6.2 Importance des bassins cellulaires des protéines de l'hôte.....	22
3.7. Essai de plaques.....	23
4. Résultats.....	25

4.1 Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions.....	25
4.2. Impact de la déplétion du bassin cellulaire des protéines de l'hôte sur la production des virions intracellulaires.....	29
4.3. Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures pour l'entrée d'HSV-1 .....	30
5. Discussion.....	33
5.1 Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions.....	34
5.2. Impact de la déplétion du bassin cellulaire des protéines de l'hôte sur la production des virions intracellulaires.....	35
5.3. Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures pour l'entrée d'HSV-1 .....	36
6. Conclusion et perspectives.....	37
Bibliographie.....	39
Annexe 1.....	49
Article: Identification of Virion-Incorporated Host Proteins Required for Herpes Simplex Virus Type 1 Infection through a RNA Interference Screen.....	51
Abstract.....	53
Author summary.....	54
Introduction.....	55
Results.....	57
Discussion.....	71
Materials and Methods.....	80
Acknowledgments.....	84
References.....	85



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Liste des protéines cellulaires, et de leurs isoformes, incorporées dans le virus mature d'HSV-1.....	12
<b>Tableau 2.</b> Fonctions et liaisons avec les virus des quinze protéines cellulaires.....	14
<b>Tableau 3:</b> Numéros de catalogue des quinze protéines testées.....	20
<b>Tableau 4:</b> Importance des protéines cellulaires associées aux virions pour la réplication d'HSV-1.....	28

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure du virus d’Herpès simplex de type 1.....	2
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique de génome d’HSV-1.....	3
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique de cycle virale dans la cellule hôte.....	6
<b>Figure 4.</b> Modèle de réplication de génome d’HSV-1.....	8
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique de mécanisme de dégradation des ARNm par des pARNi.....	10
<b>Figure 6.</b> Représentation schématique des méthodes utilisées dans les expériences de réinfection.....	21
<b>Figure 7.</b> Importance des protéines cellulaires incorporée dans les virions.....	27
<b>Figure 8.</b> Impact des déplétions des protéines cellulaires sur la production des virions intracellulaires.....	30
<b>Figure 9.</b> Rôles des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures dans l’entrée d’HSV-1.....	32
<b>Figure 10.</b> Résumé schématique de l’ordre des techniques utilisées dans cette étude et le nombre respectif des protéines cellulaires avec un effet important sur la production virale.....	38

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIHV-1	Herpèsvirus alcelaphine type 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN d'interférence
ARNm	ARN messenger
Av. J.-C.	Avant Jésus-Christ
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
CMV	Cytomégalovirus
DENV	Virus de la dengue
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
E	Précoce (gène)
EBV	Virus d'Epstein-Barr
FCS	Sérum de veau foetal
gB/M/N	Glycoprotéine B (ou M, N, etc.)
GFP	Protéine fluorescente verte
HBV	Virus de l'hépatite B
HCMV	Cytomégalovirus humain
HCV	Virus de l'hépatite C
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HPV	Virus du papillome humain
HSV	Virus de l'Herpès simplex
HSV-1	Virus de l'Herpès simplex de type 1
HTLV-1	Virus T-lymphotropique humain de type 1
HVEM	Médiateur d'entrée des herpèvirus
ICP	Infected cell protein
IE	Immédiat-précoce (gène)
IR	Inverted repeats
IRL	Inverted repeats long
IRS	Inverted repeats short
KHSV	Herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi

L	Tardif (gène)
LAT	Latency Associated Transcript
MCMV	Cytomégalovirus murin
MOI	Multiplicité d'infection
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
Ori	Origine de réplication
pARNi	Petit ARN interférent
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate
PFU	Unité formatrice de plaque
PRV	Virus de la pseudorange
RISC	RNA-induced silencing complex
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
siRNA	Small interfering RNA
SV40	Virus simien 40
TGN	Réseau trans-golgien
tk-	Timidine kinase négatif
TR	Terminal repeats
UL	Unique long
US	Unique short
Vhs	Virion host shutoff
VP	Viral protein

## Remerciements

D'abord et avant tout, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Roger Lippé, qui, malgré certains obstacles, m'a supporté tout au long de mes études. Merci Roger d'avoir cru en mes possibilités et compétences! Je remercie énormément Camille Stegen, grâce à qui, j'ai eu mon projet et j'ai pu finir mes études supérieures! Merci beaucoup Cam, pour les conseils scientifiques et personnels, pour le support technique et mental, pour l'aide à la rédaction du présent mémoire et pour ton amitié chaleureuse! Je remercie également beaucoup Sandra Loret, qui est devenue une de mes meilleurs amies. Un gros merci pour toi Sandra : tu étais toujours proche, quand je riaais, mais aussi, quand je pleurais! Je remercie cordialement Johanne de m'avoir conseillée à plusieurs reprises pour des questions professionnelles, ainsi que personnelles. Je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire, actuels et précédents, pour l'aide, les discussions, les suggestions et les commentaires.

Je remercie grandement mon époux Ivo! Merci pour ton appui moral et financier. Merci de m'avoir transporté jusqu'au laboratoire les fins de semaines, les matins, les soirs et les nuits. Merci, d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la possibilité d'acquérir ma première expérience d'intégration au Québec. N'oublie jamais, mon amour, que malgré les difficultés, je t'aime toujours!

Je remercie aussi Nicolas, d'avoir toujours été un bébé très calme et obéissant lorsqu'il nous accompagnait les nuits et les fins de semaines à l'Université. Je t'aime!

Un grand merci à ma mère qui a pris soin de mon fils et ainsi m'ai permis de reprendre mon projet de recherche. Je t'embrasse, maman! Merci aussi au reste de ma famille pour les conseils et le support! Bisous à tous!



# 1. Introduction

## 1.1. Définition et taxonomie.

Le virus de l'Herpès simplex de type 1 (HSV-1) affecte la peau et les muqueuses en causant des éruptions vésiculeuses de boutons groupés, aussi nommées feux sauvages.

Selon la dernière version de la taxonomie des virus émise par le Comité international de la taxonomie des virus, le virus HSV-1 fait partie du genre *Simplexvirus* de la sous-famille *Alphaherpesvirinae* de la famille *Herpesviridae* de l'ordre *Herpesvirales* [2].

## 1.2. Historique.

Bien que les premières observations des lésions corporelles semblables à celles causées par une infection herpétique datent de quelques 2000 ans av. J.-C., le virus de l'Herpès n'a été reconnu comme un agent infectieux qui se transmet d'un individu à un autre que dans le dernier quart du 19<sup>e</sup> siècle [3, 4]. La contribution est due au dermatologue Jean-Baptiste Émile Vidal, qui en 1893, réussit à démontrer ce fait en observant la transmission chez les humains [3, 5]. En même temps, Gruter effectue les premières expériences avec des lapins et confirme que l'Herpès est un agent contagieux qui se transmet entre les animaux [3, 6].

Dans les années 1930, grâce aux découvertes de plusieurs scientifiques, l'Herpès est reconnu comme un agent causant des maladies. La description du virus donnée par Burnet et Williams au début de 20<sup>e</sup> siècle, demeure plus ou moins actuelle. C'est eux qui émirent la suggestion qu'après la primo-infection, le virus persiste dans sa forme latente et qu'il pourrait être réactivé et causer des infections lytiques suite à différents stimuli comme le trauma, la fièvre, etc.

Depuis, ce virus reste parmi les plus intensivement étudiés. Il sert de modèle dans plusieurs domaines de la virologie et la biologie en générale. Le virus de l'Herpès est utilisé dans des études sur les interactions protéiques, la régulation des gènes, le transport intracellulaire etc. [3, 7] Mais ce ne fut que dans les années 1960, que le scientifique Schneweiss démontre qu'il existe deux types d'HSV : le type 1, qui cause surtout des

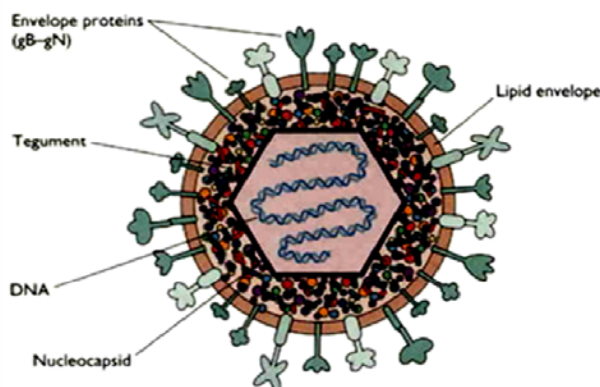
infections labiales et le type 2, qui infecte de préférence les muqueuses et la peau des zones génitales [3, 7].

Aujourd'hui, la recherche sur HSV-1 continue à pleine vitesse. Des décennies de travaux par plusieurs laboratoires ainsi que l'utilisation de techniques variées comme la culture cellulaire, la microscopie électronique, les essais biochimiques, l'immunobuvardage, les co-immunoprécipitations et l'utilisation d'outils de biologie moléculaire, comme les réactions de polymérase en chaîne, le clonage, le séquençage génétique permettent l'ample caractérisation de la structure, des protéines, du génome et des interactions hôte-pathogène d'HSV-1 [8-25].

Malgré le fait que de nombreuses caractéristiques et fonctions de l'Herpès sont connues, aucun traitement efficace et même aucune vaccin contre HSV n'existe encore [26, 27].

### 1.3. Structure d'HSV-1.

Le virus Herpès simplex de type 1 mesure environ 200 nm et se distingue par une complexité de structure élevée. Le génome viral est constitué d'ADN linéaire, bicaténaire empaqueté dans une capsidie icosaédrale. La capsidie est entourée d'une couche protéique : le tégment. Toutes ces structures sont emballées par l'enveloppe lipidique incrustée de glycoprotéines virales pour former une particule virale (Figure 1) [28].

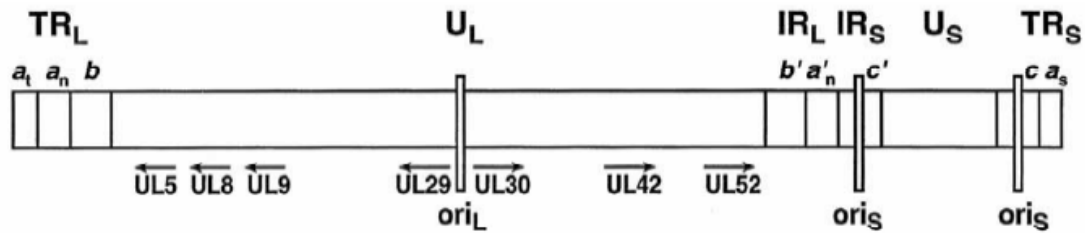


**Figure 1. Structure du virus d'Herpès simplex de type 1.** (Source : <http://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/Assets/Bio307/jehodge/page01.html>)



### 1.3.1. Génome viral.

Le génome d'HSV-1 est constitué d'ADN bicaténaire d'une longueur d'environ 152 000 paires de bases (pb). Le génome est composé de deux segments liés de façon covalente, nommés séquence unique longue (UL) et séquence unique courte (US). Des séquences répétées terminales (TR) ou inversées (IR), désignées *a*, *b*, *c* et *a'*, *b'*, *c'* se trouvent sur les extrémités des deux segments uniques TR et IR (Figure 2).



**Figure 2. Représentation schématique de génome d'HSV-1.** TR : *terminal repeats*; IR : *inverted repeats*; ori : *origine de réplication* (adapté de Lehman I R , Boehmer P E J. *Biol. Chem.* 1999;274:28059-28062 [29]).

Les génomes de quelques souches d'HSV-1 sont séquencés. La séquence peut varier d'une souche à l'autre, mais en général jusqu'à 80% est conservé parmi les *Herpesvirales*. On retrouve plusieurs cadres de lecture dans le génome qui code au total au moins 80 protéines virales. Les gènes viraux sont nommés selon leur emplacement sur le génome soit : UL1-56, US1-12, IRL1-2 et IRS1 [3, 30-32]. Toutefois, d'autres nomenclatures existent afin de nommer les produits de ces gènes incluant VP (*viral protein*) ou ICP (*infected cell protein*), suivi d'un chiffre. Aussi, les glycoprotéines sont aussi nommées gB, gC, gD, etc.

Les gènes viraux sont divisés en trois catégories selon le moment où ils sont exprimés au cours de l'infection : les gènes  $\alpha$  (*immediate early*; IE), les gènes  $\beta$  (*early genes*; E) et les  $\gamma$  (*late genes*; L). L'expression des gènes de chaque groupe est dépendante du produit du groupe de gènes qui le précède [3, 32].

### 1.3.2. Enveloppe.

Le virus d'Herpès de type 1 est un virus enveloppé dont la membrane de l'enveloppe est composée uniquement de sphingomyélines et de phosphatidylsérines, ce qui s'apparente à celle du réseau trans-golgi de la cellule hôte [33-35].

L'enveloppe lipidique est incrustée de 11 glycoprotéines virales (gB-gE et gG-gM) et de deux protéines membranaires non-glycosylées, UL49A (gN) et UL20. Les interactions entre les glycoprotéines sont complexes et ces protéines peuvent jouer des rôles tant dans l'entrée que dans la sortie du virus. Par exemple, les glycoprotéines gC, gB, gD, et l'hétérodimère gH-gL sont responsables de l'attachement et de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique [36-40], mais gB, gD et gM se retrouvent aussi sur la membrane externe du noyau, lors de la sortie du virus [41, 42]. En même temps, les glycoprotéines gK, gM et la protéine UL20 semblent aussi impliquées dans la sortie du virus de noyau [39, 40, 42]. gE-gI, gD et gM ont des rôles redondants dans le processus d'enveloppement des virus dans le cytoplasme [35, 39, 40]. De plus, il a récemment été démontré que la glycoprotéine gM était importante pour l'incorporation efficace de l'hétérodimère gH-gL dans les particules virales lors de l'enveloppement secondaire dans le cytoplasme [43].

### **1.3.3. Tégument.**

Sous l'enveloppe viral se retrouve une couche protéique, appelée tégument. Cette structure, plus ou moins organisée, réunit 24 protéines virales (UL7; UL11; UL13; UL14; UL16; UL21; UL23; UL36; UL37; UL41; UL46; UL47; UL48; UL49; UL50; UL51; UL55; US2; US3; US10; US11; RL1; RL2; RS1) acquises de façon séquentielle tout au long du cycle viral dans la cellule hôte [1]. Ces protéines ont des fonctions essentielles à la maturation du virus. Les protéines tégumentaires jouent des rôles à toutes les étapes importantes du cycle viral de HSV-1 : la régulation de l'expression des gènes cellulaires ou viraux; la réplication; l'enveloppement secondaire; le transport du virus et l'assemblage des virions [24, 44]. Plusieurs protéines du tégument possèdent des activités enzymatiques. Par exemple : UL13 et US3 sont des protéines kinases [45-52], UL23 est une thymidine kinase [53], UL36, une déubiquitine [54, 55], ICP0, une E3 ubiquitine ligase [56], alors que UL50 est une deoxyuridine triphosphatase [57, 58]. Les protéines de tégument forment des liens complexes entre elles, mais aussi avec les protéines de la capside et les protéines intégrées dans l'enveloppe du virus [44, 52, 59, 60].

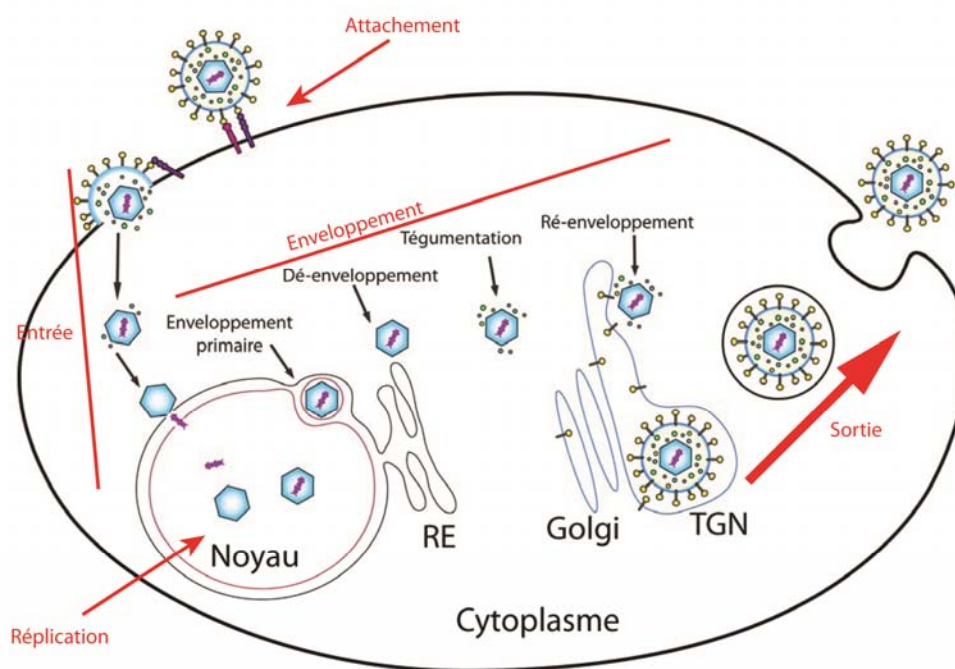
### **1.3.4. Capside.**

La capside se retrouve à l'intérieur de la particule virale et elle emballe le génome d'HSV-1. Elle mesure environ 100 nm de diamètre avec une forme icosaédrique très organisée. La capside mature est formée de sous-unités protéiques appelées capsomères constituées de la protéine VP5 (UL19) en cinq copies (pentons) ou six copies (hexons). Au total, la capside est composée de 162 capsomères. Elles sont connectées par des triplexes formés par la protéine VP19c (UL38) et de deux copies de la protéine VP23 (UL18) [61]. De plus, la protéine VP26 (UL35) se lie aux hexons de VP5 [62]. Le génome viral est incorporé dans la capside par une structure nommée « portal » qui est composée de douze unités de la protéine UL6 liées par des ponts disulfures et fermées par un bouchon formé par la protéine UL25 [63-65].

Avant que le génome viral soit incorporé, les capsides assument une forme plus arrondie. Cette capside immature est aussi appelée procapside. Elle contient les protéases VP24 et VP21, codées par le gène UL26, ainsi que la protéine d'échafaudage VP22 (UL49). Ainsi, dépendamment du degré de maturation des procapsides, lors de l'infection, trois types de capsides peuvent être isolées : les capsides A, B et C. Les capsides A sont immatures et ne contiennent ni protéine d'échafaudage, ni ADN. Les capsides B ne contiennent pas ou peu d'ADN mais contiennent les protéines d'échafaudage tandis que les capsides C correspondent à la forme mature et complète pouvant être utilisées pour la formation de nouveaux virions infectieux [3, 66-68].

## **1.4. Cycle viral**

Le périple du virus (schématiquement présenté dans la Figure 3) dans la cellule hôte peut être divisé en quelques étapes : l'attachement et l'entrée dans la cellule, la réplication du génome, l'enveloppement et la sortie de la cellule. Les caractéristiques des différentes étapes seront exposées séparément.



**Figure 3. Représentation schématique de cycle viral dans la cellule hôte.** Les différentes étapes du cycle viral sont démontrées avec des lignes et des flèches rouges. (Modifié de «Analyse des protéines cellulaires incorporées dans les particules matures du virus de l'Herpès simplex de type 1», Camille Stegen, Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 2011).

#### 1.4.1. Entrée du virus dans la cellule hôte.

La première étape de l'infection est l'attachement du virus à la cellule hôte. Cet événement, réversible et dépendant du type cellulaire, peut s'effectuer de différentes façons soit par une fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule; par une fusion avec la membrane d'un endosome acide, donc dépendante du pH ou par une fusion avec la membrane d'un endosome neutre (indépendante du pH) [3, 25, 69]. Ce processus se déroule très vite et cinq glycoprotéines virales ainsi qu'un récepteur cellulaire sont impliqués. Pour que la particule virale s'attache, la glycoprotéine gB et/ou gC interagissent avec le sulfate d'héparan présent à la surface des cellules. Malgré que cette étape préliminaire ne soit pas essentielle à l'infection, elle peut faciliter l'étape suivante de l'entrée, notamment l'interaction de la glycoprotéine gD avec son récepteur cellulaire [69-71]. gD peut lier différents récepteurs : nectine-1 (HveC) [72], le médiateur de l'entrée des virus herpès (HVEM) [73, 74] ou le 3-O-sulfate d'héparan [75]. Cette liaison entraîne des changements dans la conformation de gD lui permettant d'interagir avec gB et avec

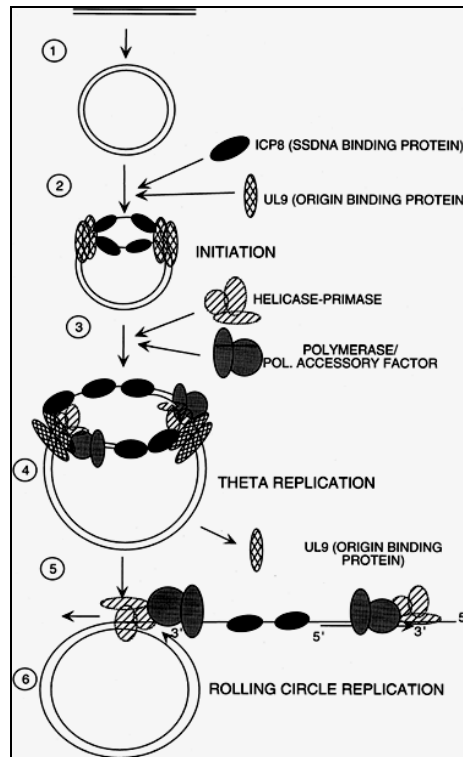
l'hétérodimère gH/gL et de cette manière de déclencher le mélange lipidique et la fusion entre l'enveloppe d'HSV-1 et la membrane plasmique de la cellule hôte [76, 77]. La capside virale et le tégument sont libérés dans le cytoplasme où UL36 et/ou UL37 se lient aux microtubules, permettant ainsi la transportation de la capside jusqu'au noyau pour y injecter l'ADN viral à travers les pores nucléaires [78, 79].

### **1.4.2. Transcription des gènes viraux.**

Une fois entré dans le noyau, le génome viral doit se multiplier. Pour ce faire, le virus doit générer de grandes quantités de protéines virales requises pour l'assemblage de nouveaux virions. La transcription des ARNs messagers (ARNm) viraux est faite par l'ARN polymérase II [80] et les gènes viraux s'expriment séquentiellement. Les ARNm des premiers gènes, nommés  $\alpha$ , sont synthétisés dans les deux à quatre heures suivant l'entrée du virus. Les protéines produites par ces gènes sont ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 et U<sub>S</sub>1.5 [3]. Leur synthèse est facilitée par les protéines du tégument que le virus porte avec lui en rentrant dans la cellule. Une des plus importantes est la protéine transactivatrice VP16 (UL48) [81-83]. Une fois synthétisées, les protéines alpha favorisent la transcription des gènes  $\beta$ . Ces protéines sont responsables de la réplication de l'ADN viral. Les produits des gènes  $\beta$  ne sont synthétisés qu'en présence de synthèse des protéines  $\alpha$ . L'expression du dernier groupe d'ARNm viraux, issue des gènes  $\gamma$ , est stimulée par l'initiation de la réplication du génome viral. Les gènes  $\gamma$  encodent des protéines structurales du virus [3, 32, 84].

### **1.4.3. Réplication du génome d'HSV-1.**

Après que les protéines  $\beta$  aient été synthétisées, certaines forment des complexes de réplication près des domaines ND10 dans le noyau de la cellule hôte où le génome d'HSV-1 se circularise [85]. Ce mode de réplication est nommé  $\theta$  (Figure 4). Relativement tôt après son initiation, la réplication passe de type  $\theta$  au type de cercle roulant, ce qui mène à la production de longs concatémères d'ADN viral qui sont clivés en monomères avant leur emballage dans les procapsides [3, 29, 86-90]. Ainsi, les capsides contenant de l'ADN sont prêtes à quitter le noyau pour s'envelopper dans le cytoplasme.



**Figure 4. Modèle de réplication du génome d'HSV-1.** *Étapes : 1) l'ADN viral nouvellement entré dans le noyau de la cellule hôte se circularise. 2) UL9 se lie aux éléments spécifiques dans l'origine de réplication et commence à détendre l'ADN. UL9 est aussi responsable du recrutement de la protéine ICP8, une protéine qui se lie à l'ADN simple brin qui de son côté déroule l'ADN simple brin. 3) UL9 et ICP8 recrutent les cinq autres protéines virales aux fourches de réplication. 4) Les protéines hélicases-primases UL5, UL8 et UL52 et le complexe de polymérase virale UL30 et UL42 se réunissent à chaque fourche de réplication pour l'initiation de la réplication de type thêta ( $\theta$ ). 5) Passage de la réplication de type  $\theta$  en mode cercle roulant par un mécanisme inconnu. 6) La réplication de type cercle roulant produit de longs concatémères d'ADN viral qui sont clivés en monomères lors de l'emballage dans les procapsides. (Schéma et texte modifié de Fields' virology. 5th ed, 2007, [3].)*

#### 1.4.4. Modèle d'enveloppement d'HSV-1.

Parmi les différents modèles d'enveloppement des capsides nouvellement assemblées, le plus généralement accepté est le modèle de l'enveloppement/déenveloppement/réenveloppement (Figure 3, partie désignée enveloppement en rouge). Selon ce modèle, après leur assemblage, les nucléocapsides quittent le noyau en bourgeonnant au travers de la membrane nucléaire interne. De cette manière, les nucléocapsides se retrouvent dans l'espace perinucléaire acquérant ainsi leur première enveloppe. Par la suite, les capsides se dé-enveloppent en fusionnant avec la

membrane nucléaire externe est passent dans le cytoplasme, pour se rassembler dans le réseau trans-golgien (TGN) où se déroule l'étape finale de réenveloppement [91]. Lors d'une infection productive, la plupart des glycoprotéines sont synthétisées selon la voie classique de synthèse des glycoprotéines et s'accumulent au TGN [35]. Les capsides se dirigent vers les membranes du TGN lesquelles sont incrustées avec des glycoprotéines virales et y bourgeonnent pour former des particules virales complètes. Les virions ainsi assemblés sortent des cellules en utilisant le transport vésiculaire [92, 93]. Il existe de nombreuses évidences démontrant que la protéine kinase D (PKD), une protéine reconnue pour médier la fission au TGN de petits cargos destinés à rejoindre la membrane plasmique, serait impliquée dans la sortie d'HSV-1[94, 95]. Malgré que ce modèle soit largement accepté, le mécanisme précis de transport des capsides de la membrane externe du noyau au TGN reste encore méconnu.

#### **1.4.5. Phase de latence.**

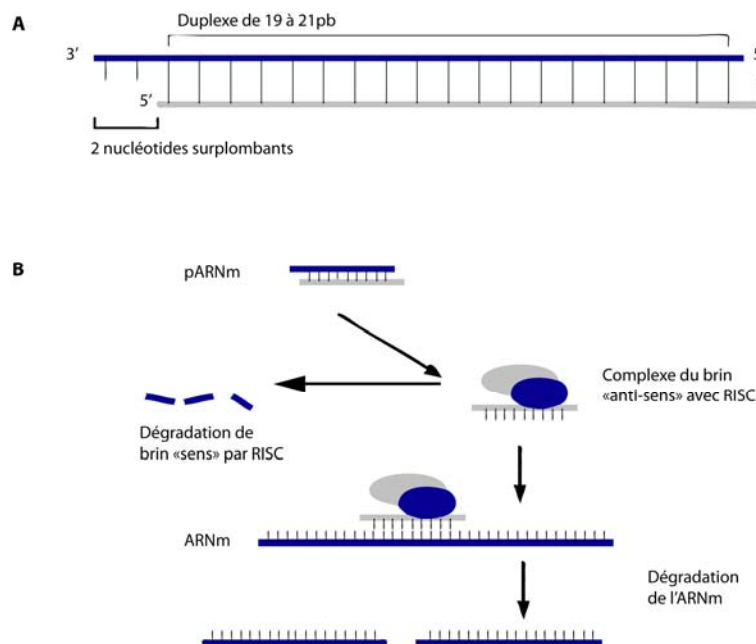
Tous les virus classés dans l'ordre *Herpesvirales* ont la particularité de former une infection latente (dormante) chez l'hôte infecté. Lors de la primo-infection, une infection lytique, HSV-1 infecte les cellules épithéliales de la région du contact. Les virus nouvellement synthétisés infectent les cellules avoisinantes pour éventuellement infecter les axones des neurones du nerf trijumeau et du ganglion de Gasser. Dans les neurones, le virus monte jusqu'aux noyaux en utilisant les voies de transport cellulaire rétrograde et y persiste pour le reste de la vie de son hôte [96]. Chez HSV-1, cette persistance est causée par des génomes viraux non réplicatifs présents sous forme de concatémères épisomaux dans les neurones. Le génome latent est associé à de nombreux histones hypoacétylés, il est donc très condensé et inadapté pour la réplication [97]. De plus, lors de la latence, il n'y a pas ou très peu d'expression de protéines virales. Durant la latence, il y a une maintenance d'une activité de transcription des gènes LATs (*Latency Associated Transcripts*) [98]. Ces ARNm viraux ne sont pas traduits en protéines, mais via des microRNA elles inhibent l'apoptose cellulaire et la synthèse des protéines virales ICP0 et ICP4 qui sont nécessaire pour l'infection lytique [99-101]. La réactivation d'HSV-1 est induite lorsque l'organisme de l'hôte subi un stress. Les processus qui suivent consistent en diminution de nombre des transcripts *LAT*, causant par conséquent une augmentation du nombre des transcripts des

gènes lytiques, la réplication du génome viral et une production de nouvelles particules virales. [3, 102].

### 1.5. Mécanisme d'action des ARN d'interférence et leur application dans les études des interactions hôte-pathogène.

Le phénomène d'interférence par ARN a été observé pour la première fois chez le nématode *Caenorhabditis elegans* comme une réponse de défense contre les ARN doubles brins étrangers (ARNdb), induisant l'inhibition spécifique de l'expression d'un gène [103].

Les petits ARN interférents (pARNi) sont des molécules bicaténares d'une longueur variant entre 19 et 23 pb (d'habitude 21 pb) avec 2 nucléotides surplombants à chaque extrémité 3'-OH (Figure 5, A). Une fois introduits dans la cellule, les pARNi déclenchent un mécanisme de dégradation des ARNm médié par le complexe enzymatique RISC (*RNA-induced silencing complex*; Figure 5, B) [104-107]. Après la dégradation de l'ARNm, la protéine ne peut pas être synthétisée et le niveau de la protéine ciblée diminue. La déplétion observée demeure cependant transitoire puisque les pARNi transfectés dans les cellules se diluent au cours des divisions cellulaires.



**Figure 5. Représentation schématique du mécanisme de dégradation des ARNm par des pARNi.** A) Structure d'un petit ARN d'interférence. B) Dans la cellule les pARNi sont reconnues par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), qui catalyse la transformation des pARNi de molécules



*bicaténaires à deux molécules monocaténares. Le complexe RISC/pARNi monocaténaire «anti-sens» se lie spécifiquement avec l'ARNm- ciblée. Cette liaison entraîne la dégradation de l'ARNm. La molécule ARN monocaténaire «sens» est dégradée. (Image modifié de <http://upload.wikimedia.org>).*

Depuis la découverte que les pARNi peuvent induire une inactivation génique, les chercheurs ont investi des efforts considérables dans l'optimisation de cette technologie pour effectuer des études de génomique fonctionnelle. Jusqu'à maintenant, les techniques utilisant des pARNi sont largement employées pour étudier les fonctions de protéines d'intérêt. Ils existent plusieurs banques commerciales d'ARNi humains ou animaux, ce qui permet la réalisation des criblages génomiques à grande échelle. En effet, des criblages du génome humain complet ont été effectués afin d'identifier les protéines cellulaires qui influencent les cycles de réplication de plusieurs virus dont HIV [108-110], le virus du Nil occidental [111], le virus de l'influenza [112] et le virus de l'hépatite C (HCV) [113]. Ainsi, des nouvelles protéines potentiellement impliquées dans les cycles viraux de ces virus ont été mis en évidence.

Jusqu'à présent, l'utilisation des pARNi a démontré l'importance de certaines protéines cellulaires pour la réplication d'HSV-1. Par exemple, l'implication de la protéine kinase D (PKD) dans la transportation de TGN vers la membrane plasmique des virus sortants de la cellule-hôte [94]. Les rôles des protéines Rab1 et Rab43 dans l'enveloppement secondaire d'HSV-1 [114] et l'importance de l'interaction entre la kinase virale US3 et la protéine cellulaire PDCD 4 (*Programmed Cell Death Protein 4*) pour le blocage de l'apoptose ont été élucidés à l'aide des pARNm [115]. Aussi, le rôle de la kinase cycline-dépendante 9 (cdk9) dans l'expression des gènes régulés par la protéine ICP22 [116], celui des protéines SRp20 et 9G8 dans l'export nucléaire d'ARNm viraux [117] et la nécessité de la liaison du facteur d'initiation de la traduction eIF4H à la protéine virale Vhs, pour que cette dernière joue son rôle de dégradation des ARNm cellulaires sont d'autres exemples qui utilisent les mêmes approches pour clarifier les rôles de ces protéines [118].

### **1.6. Incorporation de protéines de l'hôte dans le virus mature.**

Beaucoup de virus incorporent des protéines cellulaires. Dans la littérature scientifique de nombreuses évidences peuvent être trouvés pour plusieurs types de virus

[119], comme c'est le cas chez le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [120], le virus de la vaccine [121], le virus influenza [122] ainsi que le virus de la stomatite vésiculaire [123]. L'incorporation de protéines cellulaires a été caractérisée chez plusieurs membres de la famille des Herpèsvirus. Par exemple, des analyses protéomiques ont été effectués pour les virus HCMV[124], MCMV[125], PRV [126], EBV [127] et KSHV [128] et chez l'herpèsvirus Alcelaphine type 1 (AIHV-1) [129]. En outre, notre laboratoire a effectué la première analyse protéomique des virions matures de HSV-1, ce qui a permis d'identifier l'incorporation de quarante-neuf protéines cellulaires (Tableau 1, [1]). Ces protéines sont impliquées dans différents processus cellulaires : le transport vésiculaire (les Rab, les Arf), la régulation de la réponse immunitaire (cyclophilin A, CD59), la machinerie d'ubiquitylation (UBC, UBE2L3) et la régulation de l'expression génique (DDX3X, HSPA8, EIF4H).

**Tableau 1. Liste des protéines cellulaires, et de leurs isoformes, incorporées dans le virus mature d'HSV-1.** Les quinze protéines cellulaires trouvées importantes pour HSV-1 lors de criblage aux pARNi sont marquées en jaune. (Source, «Analyse des protéines cellulaires incorporées dans les particules matures du virus de l'Herpès simplex de type 1», Camille Stegen, Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 2011).

Nom	Gene ID	Symbole	Nom	Gene ID	Symbole
14-3-3 $\epsilon$	7531	YWHAE	Peroxiredoxin-2	7001	PRDX2
14-3-3 $\gamma$	7532	YWHAG	Profilin-1	5216	PFN1
14-3-3 $\zeta/\delta$	7534	YWHAZ	Programmed cell death protein 6	10016	PDCD6
$\alpha$ -actin	58	ACTA1	Rab2a	5862	RAB2A
$\beta$ -actin	60	ACTB	Rab2b	84932	RAB2B
$\gamma$ -actin	71	ACTG1	Rab4b	53916	RAB4B
Annexin A1	301	ANXA1	Rab5a	5868	RAB5A
Annexin A2	302	ANXA2	Rab5b	5869	RAB5B
Annexin A5	308	ANXA5	Rab5c	5878	RAB5C
Arf1	375	ARF1	Rab6a	5870	RAB6A
Arf3	377	ARF3	Rab6b	51560	RAB6B
Arf4	378	ARF4	Rab6c	84084	RAB6C
Arf5	381	ARF5	Rab7A	7879	RAB7

ATP dependant RNA helicase DDX3X	1654	DDX3X	Rab10	10890	RAB10
Casein kinase 2	1457	CSNK2A1	Rab11a	8766	RAB11A
Cofilin 1	1072	CFL1	Rab11b	9230	RAB11B
Cyclophilin A	5478	PPIA	Rab15	376267	RAB15
Cystein-glycin rich protein 1	1465	CSRP1	Rab33B	83452	RAB33B
Eukaryotic translation initiation factor 4H	7458	EIF4H	Rab35	11021	RAB35
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	GAPDH	Rab-like protein 3	285282	RABL3
Growth factor receptor bound protein 2	2885	GRB2	S100 calcium protein binding A11	6282	S100A11
Heat Shock 70 protein 8	3312	HSPA8	SEC14-like 4	284904	SEC14L4
Keratin 1	3848	KRT1	Tetraspanin 13	27075	TSPAN13
Keratin 10	3858	KRT10	Transferrin Receptor (CD71)	7037	TFRC
1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 9	84803	AGPAT9	Transgelin 2	8407	TAGLN2
Macrophage Migration Inhibitory Factor	4282	MIF	Translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog	92609	TIMM50
CD59	966	CD59	Triosephosphatase isomerase	7167	TPI1
NM23A	4830	NME1	Ubiquitin C	7316	UBC
NM23B	4831	NME2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	7332	UBE2L3
Peroxiredoxin-1	5052	PRDX1			

Afin de tester ces protéines, le laboratoire a mis au point un système de criblage qui quantifie le virus présent dans les cellules infectées ou relâchées dans le milieu extracellulaire en utilisant un virus marqué à la GFP ainsi que des ARN d'interférence ciblant spécifiquement les quarante-neuf protéines cellulaires (Annexe 1). En principe, si une des protéines testées est nécessaire au virus, son absence devrait perturber le cycle viral et résulter en une diminution du signal de la GFP détectée dans le milieu extracellulaire. En accord avec ce principe, les résultats indiquent que quinze des quarante-neuf protéines cellulaires incorporées dans le virus sont biologiquement pertinentes pour le virus et impliquées dans son cycle viral (Tableau 1, en jaune; Annexe 1).

## 1.7. Fonctions des quinze protéines cellulaires importantes pour HSV-1. Rôles dans les infections virales.

Les protéines cellulaires incorporées par les virus matures d'HSV-1 ont des fonctions diverses chez l'hôte et certaines d'entre elles ont déjà été démontrées importantes pour HSV-1 et d'autres virus. La liste complète des noms et des fonctions des protéines cellulaires ainsi que les rôles dans les infections virales sont représentée dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Fonctions et liaisons avec les virus des quinze protéines cellulaires.**

Gene ID Symbole	Fonctions *	Rôles dans les infections virales	Références
YWHAG 7532	Protéine adaptatrice impliquée dans la régulation d'un large spectre de voies de signalisation à la fois générales et spécialisées. Se lie à un grand nombre de partenaires, généralement par la reconnaissance d'un motif phosphosérine ou la phosphothréonine. Ses liaisons résultent généralement dans la modulation de l'activité du partenaire de liaison. Phosphorylée par diverses iso-enzymes de PKC. Cytoplasmique.	Liaison avec le C-terminal des protéines 14-3-3 pour promouvoir l'expression à la membrane plasmique du corécepteur GPR15 de VIH-1. 14-3-3 peut faciliter la formation de complexe entre la protéine Vpr de VIH-1 et Cdc25 pour réguler le cycle de vie de la cellule hôte.	[130-132]
YWHAZ 7534	Protéine adaptatrice impliquée dans la régulation d'un large spectre de voies de signalisation à la fois générales et spécialisées. Se lie à un grand nombre de partenaires, généralement par la reconnaissance d'un motif phosphosérine ou la phosphothréonine. Ses liaisons résultent généralement dans la modulation de l'activité du partenaire de liaison. Cytoplasmique.	La protéine de latence LANA2 de KSHV inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO3a et bloque l'arrestation en G2/M induite par la surexpression des 14-3-3, suggérant un nouveau mécanisme de tumorigénèse.	
ARF1 375	Protéine se liant à la GTP qui fonctionne comme un activateur allostérique de la sous-unité catalytique de toxine cholérique, une ADP-ribosyltransférase. Impliquée dans le trafic des protéines entre des différents compartiments cellulaires. Module le bourgeonnement vésiculaire et le dés-enrobage dans l'appareil de Golgi. Une désactivation induit la redistribution de tout le complexe de Golgi vers le réticulum endoplasmique, suggérant un rôle crucial dans le trafic de protéines. Dans sa forme liée à la GTP, Arf 1 déclenche l'association avec des protéines des enveloppes avec la membrane de Golgi. L'hydrolyse de la protéine ARF1 lié à la GTP, qui est médiée par des protéines GAPs des ARFs, est nécessaire pour la dissociation des protéines des enveloppes à partir de membranes de Golgi et des vésicules.	Les virus avec un génome d'ARN modulent le recrutement des effecteurs via Arf1 et GBF1 ainsi promouvant la production des nouveaux organites enrichis en PI4P, qui représentent les sites de synthèse des protéines virales.	[133]
DDX3X 1654	ATP-dépendante ARN hélicase. Identifié dans un complexe RNPm, au moins composé de DHX9, DDX3X, ELAVL1, HNRNPU, IGF2BP1, ILF3, PABPC1, PCBP2, PTBP2, Stau1, STAU2, SYNCRIP et YBX1. Localisation subcellulaire: Noyau. Cytoplasme. Remarque: Situé principalement dans spécules nucléaires et en faibles niveaux, à travers le cytoplasme. Situé sur le côté extérieur des complexes des pores nucléaires. Navettes entre le noyau et le cytoplasme d'une manière XPO1-dépendante. Modification post-traductionnelle: phosphorylé par TBK1 ".	Agit comme cofacteur dans l'export nucléaire des ARN de la protéine Rev de VIH-1 épissés de façon incomplète médiée par XPO1. Participe également dans la réplication du VIH-1. L'interaction spécifique avec la protéine de capsid du virus de l'hépatite C entraîne un changement dans la localisation intracellulaire.	[134, 135]
EIF4H 7458	Stimule l'activité ARN hélicase d'eIF4A dans le complexe d'initiation de la traduction. Lie faiblement les ARNm. Localisation subcellulaire: cytoplasme et région péri nucléaire.	Interagit avec la protéine Vhs (UL41) d'HSV-1.	[118, 136]

HSPA8 3312	Agit comme un répresseur de l'activation transcriptionnelle. Inhibe l'activité co-activatrice transcriptionnelle de CITED1 dans la transcription médiée par Smad. Chaperonne (Escorte). Isoforme 2 peut fonctionner comme un régulateur endogène inhibiteur d'HSC70 par la concurrence des co-chaperonnes. Interagit avec BAG1. Localisation subcellulaire: localisée dans les granules RNPm cytoplasmiques contenant des ARNm non traduits. Sous un choc thermique, translocation rapide du cytoplasme vers le noyau, et en particulier aux nucléoles.	Interagit avec la protéine VP1 de SV40 suggérant un rôle dans le processus d'emballage des particules virales. HSPA8 et d'autres protéines chaperons, sont retenues aux foyers distincts dans les noyaux des cellules infectées avec HSV-1. HSPA8 facilite la fusion cellulaire et la formation des syncytia cellulaires par le virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1).	[137-139]
KRT10 3858	Ce gène code pour un membre du type I (acide) de la famille des cytokératines. Les kératines sont protéines structurales hétéro polymériques qui forment les filaments intermédiaires. Ces filaments, ensemble avec les microfilaments d'actine et les microtubules, composer le cytosquelette des cellules épithéliales. Probablement, prend part dans réponse cellulaire aux ions de calcium.	Une infection par HPV peut altérer le statut de différenciation de l'épiderme, ce qui peut entraîner le délai ou l'absence d'expression de KRT1/KRT10.	[140]
MIF 4282	Ce gène code pour une lymphokine impliquée dans l'immunité cellulaire, l'immunorégulation et l'inflammation. Il joue un rôle dans la régulation de la fonction des macrophages dans la défense de l'hôte via la suppression des effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes. Cette lymphokine et la protéine JAB1 forment un complexe dans le cytosol à proximité de la membrane plasmique périphérique, ce qui pourrait indiquer un rôle supplémentaire dans les voies de signalisation des intégrines.	Le MIF induit par l'infection au DENV peut contribuer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La glycoprotéine gp120 de VIH-1 induit la sécrétion de MIF dans des cellules mononuclées du sang périphérique. L'infection au HCMV déclenche une synthèse <i>de novo</i> et une sécrétion subséquente de MIF.	[141-143]
CD59 966	Inhibiteur puissant de l'action du complexe MAC. Agit en se liant aux compléments C8 et/ou C9 de l'assemblage de MAC, empêchant ainsi l'incorporation des copies multiples de C9 nécessaires à la formation complète des pores osmotiques. Cet inhibiteur semble être spécifique à l'espèce. Impliquées dans la transduction du signal pour l'activation des cellules T. Interagit avec l'antigène de surface CD2 des cellules T. Localisation subcellulaire: la membrane cellulaire; ancrage des lipides, ancrage de GPI. Sécrétée. Remarque: la forme soluble se retrouve dans plusieurs types de tissus.	L'incorporation de CD59 dans les virions de HCV dérivés des lignées cellulaires ainsi que du plasma, protège le virus contre la destruction, médiée par le complément. HBx de HBV augmente l'activité du promoteur de CD59.	[144, 145]
RAB2A 5662	Requis pour le transport des protéines du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi.	Peut-être important pour les cycles cellulaires des virus utilisant le compartiment intermédiaire.	[146, 147]
RAB5A 5868	Requis pour la fusion des membranes plasmiques et endosomes précoces. Contribue à la régulation des extensions des filopodes.	Impliquées dans les entées de plusieurs virus qui utilisent le voie d'endocytose.	[148-153]
RAB5B 5869	Transport des protéines. Probablement impliqué dans le trafic vésiculaire.		
RAB6A 5870	Transport des protéines. Régulateur de trafic membranaire de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique. Faible activité GTPase.	Interagit de façon indirecte avec pp150 de HCMV via son interaction avec la protéine cellulaire Bi-caudal D1.	[154]
RAB10 10890	Probablement impliqués dans le trafic vésiculaire et la libération des neurotransmetteurs.	Incorporée dans les virions intracellulaires matures de virus de la Vaccine.	[155]
RAB11A 8766	Régulateur du recyclage par endocytose. Peut exercer ses fonctions en interagissant avec plusieurs protéines effectrices dans différents complexes. Agit comme un régulateur majeur dans la livraison des membranes pendant la cytokinèse. Avec MYO5B et RAB8A participe à la polarisation des cellules épithéliales. Il translocalise ensemble avec RAB11FIP2 dès les vésicules du compartiment de recyclage d'endocytose à la membrane plasmique. RAB11A se localise dans le sillon de clivage.	Le vRNP du virus de grippe A interagit avec RAB11 via l'ARN polymérase virale. RAB11A est nécessaire pour la correcte transportation des vRNP jusqu'à la membrane plasmique.	[156, 157]

\*Sources : <http://www.uniprot.org>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.genecards.org>



## **2. Introduction du projet et objectifs**

En 2008, notre laboratoire a été le premier à rapporter l'incorporation de quarante-neuf protéines cellulaires dans les virus d'HSV-1 extracellulaires matures. L'importance de ces protéines ainsi que des leurs isoformes a été testée en utilisant des ARN d'interférence. Lors de ce criblage, ont été identifiées 15 protéines cellulaires dont la déplétion s'est avérée importante pour la propagation d'HSV-1. Nous nous sommes ensuite demandé quelle est l'importance pour le virus de l'incorporation des protéines de l'hôte, dans quelle étape de son cycle elles sont impliquées et finalement, nous avons voulu savoir si HSV-1 avait besoin de certaines de ces protéines cellulaires pour faciliter son entrée dans les cellules hôtes. L'objectif de ce projet de maîtrise était donc de résoudre ces questions.





### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1. Lignées cellulaires, virus.

Des cellules 143B tk- et Vero, ont été cultivées dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% sérum fœtal de veau (FCS, HyClone) et 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu des cellules 143B a également été supplémenté avec 15µg/ml 5-bromo-2 désoxyuridine (BrdU; Sigma), sauf avant les transfections et les infections. Le virus d'HSV-1(souche KOS) codant pour la protéine fluorescente GFP, couplée à une des protéines de la capside, le K26GFP a été fournie par Prashant Desai et a été propagé sur des cellules BHK et titré sur des cellules Vero, comme décrit précédemment [158]. Le virus HSV-1(17+)LoxLuc, codant pour une luciférase, et le virus de type sauvage HSV-1(17+)LoxWT, ont été généreusement fournis par Dr. Beate Sodeik. Le gène de la luciférase est sous le contrôle d'un promoteur CMV et est incorporé entre les gènes UL55 et UL56.

#### 3.2. Anticorps.

L'anticorps primaire R648 anti-DDX3 (1:1000) était un don généreux du Dr A. Patel [159], alors que l'anticorps anti-VP16 (1:1000) a été gentiment fourni par Dr H. Browne. Les anticorps anti-VP5 (1:2000) et anti-ARF-1(1:500) proviennent des sources commerciales (Cedarlane). Les anticorps secondaires chèvre anti-souris et anti-lapin ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch.

#### 3.3. Immunobuvardage de type Western.

Pour vérifier l'efficacité des pARNi sur l'expression des protéines ciblées, des cellules 143B ont été transfectées pendant 48 heures avec la Lipofectamine seule ou avec des pARNi puis infectés ou non avec K26GFP à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 pour 24 heures. Les virus extracellulaires ont été concentrés pendant 2 heures à 18 000×g et remis en suspension dans 10 µl de PBS. Les cellules infectées ont été aussi collectées, lavées dans du PBS et lysées par 3 cycles de gel-dégel rapides. Sauf indication contraire, la même quantité de protéines ont été déposée sur gel d'SDS-PAGE [1, 160] pour

l'électrophorèse. Des anticorps contre les protéines virales VP5 et VP16 ou les protéines cellulaires humaines DDX3X et ARF1 ont été utilisés pour l'immunobuvardage.

### 3.4. Transfection aux ARNi.

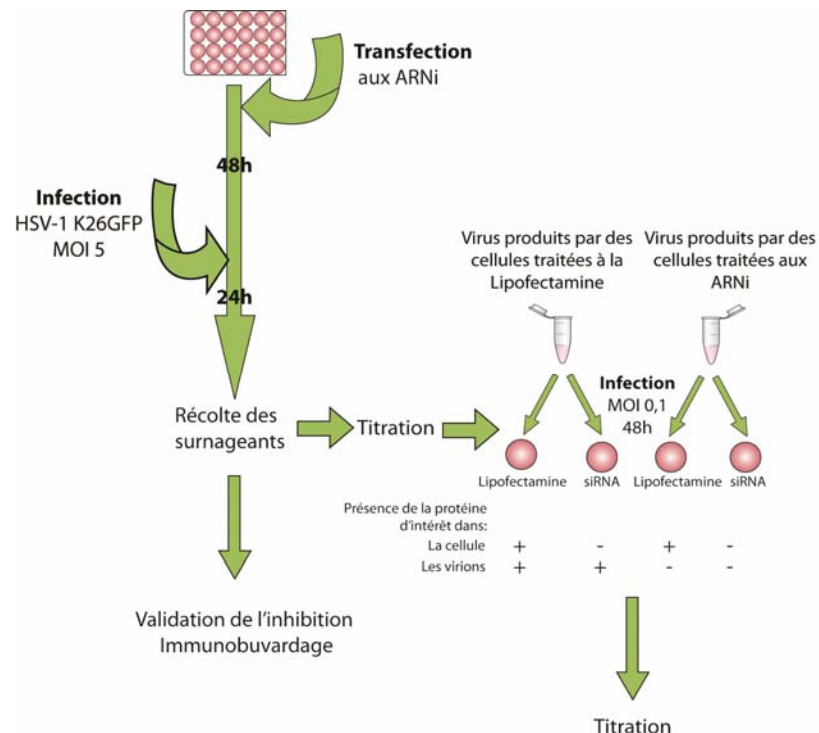
Des pARNi siGENOME SMARTpool (mélange de quatre pARNi contre le même gène), ciblant les quinze protéines humaines précédemment identifiées ont été achetés chez Dharmacon (tableau 3; Thermo Fisher Scientific) ([1], Annexe 1). Le pARNi publié ciblant la protéine VP16 d'HSV-1 a été utilisé comme contrôle positif [161] et une séquence brouillée de l'ARNi de VP16 a été utilisé comme contrôle négatif. Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules 143B ont étéensemencées dans des plaques 24 puits ( $2\text{cm}^2$ ) à une concentration de  $5 \times 10^4$  cellules/puits. Les transfections aux ARNi ont été ensuite effectuées en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 1 à 2  $\mu\text{l}$ /puits de Lipofectamine 2000 a été diluée dans d'OptiMEM (Invitrogen) et incubé pendant 5 minutes avant l'incorporation de 25 ou 100 nM/puits d'ARNi dilués dans de l'OptiMEM ou seulement OptiMEM comme contrôle. Les mélanges ont été incubés pendant 20 minutes et le DMEM remplacé par de l'OptiMEM. Les mélanges d'ARNi ont ensuite été ajoutés aux cellules, incubés pendant 5 heures avant que le milieu soit remplacé par du DMEM (complété avec 10% de FBS et de L-glutamine) et incubés pendant 43 heures de plus, pour un total de 48 heures de transfection. Après la transfection les cellules ont été infectées avec HSV-1 comme décrit plus bas.

**Table 3: Numéros de catalogue des mélanges des pARNi ciblant les quinze protéines cellulaires testées.**

Symbol	Numéros de catalogue	Symbol	Numéros de catalogue
YWHAG	M-008844-00	CD59	M-004537-01
YWHAZ	M-003332-01	RAB2A	M-010533-01
ARF1	M-011580-01	RAB5A	M-004009-00
DDX3X	M-006874-01	RAB5B	M-004010-01
EIF4H	M-013054-00	RAB6A	M-008975-01
HSPA8	M-017609-01	RAB10	M-010823-01
KRT10	M-023057-00	RAB11A	M-004726-02
MIF	M-011335-01		

### 3.5 Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions (Réinfections).

Des cellules 143B ont été transfectées aux ARNi ou avec l'agent de transfection seulement pour 48h. À ce moment, les cellules furent infectées ou pas avec HSV-1 K26GFP à une MOI de 5. Après une période d'absorption d'une heure, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS, du DMEM complété a été ajouté dans les puits et les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires. Les surnageants (virus matures extracellulaires) ont été recueillis, titrés sur cellules Vero et utilisés pour réinfecter des cellules 143B fraîches lesquelles ont été transfectées ou pas aux ARNi pour 48 heures comme précédemment. Elles ont ensuite été infectées à une MOI de 0,1 pour 48 heures, avec les surnageants (HSV-1 K26GFP extracellulaire) titrés de la précédente série de transfection-infection. Les surnageants ont été recueillis et titrés sur des cellules Vero (Figure 6). Chaque expérience a été réalisée en duplicata et répétées trois fois.



**Figure 6. Représentation schématique des méthodes utilisées dans les expériences de réinfection.** (Adapté de C. Stegen et al, *Identification of Virion-Incorporated Host Proteins Required for HSV-1 Infection Through a RNA Interference Screen*, présentation oral, IHW 2011 ).

### **3.6 Essai d'entrée.**

#### **3.6.1 Importance des bassins des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures d'HSV-1.**

Des cellules 143B ont été transfectées aux pARNi contre 7 des 8 protéines cellulaires (YWHAG, DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, RAB5A, RAB6A et RAB10) trouvées significatives pour l'HSV-1 lors des expériences de réinfections ou avec l'agent de transfection seulement. Pour des raisons techniques, la production des virus déplétés de la protéine YWHAG n'a pas été effectuée, en suite de quoi, ces virus ont été exclus des expériences d'entrée d'HSV-1. Après 48h de transfection aux pARNi, les cellules furent infectées ou pas avec HSV-1(17+)-LoxLuc à une MOI de 5. Après une période d'absorption d'une heure, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS, du DMEM complété a été ajouté dans les puits et les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires. Les surnageants (virus matures extracellulaires) ont été recueillis et titrés sur cellules Vero. Des cellules 143B fraîches ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une concentration de  $2 \times 10^4$  cellules/puits. Vingt-quatre heures après, elles ont été infectées à une MOI de 10 par des virus HSV-1(17+)-LoxLuc déplétés individuellement des sept protéines cellulaires. Pour synchroniser l'infection, les plaques ont été incubées pendant 1h à 4°C. Ensuite, elles ont été transférées pour 1h à 37°C avec faible agitation. Les tapis cellulaires ont été ensuite lavés 2 fois au PBS 1x et les cellules ont été lysées, en agitant pendant 15 minutes à la température de la pièce, avec 20 µl/puits de tampon de lyse 1X Firefly Lysis Buffer (Firefly Luciferase Assay Kit, Biotium). La luminescence émise a été détectée à l'aide du luminomètre LUMistar Galaxy (BMG Labtechnologies) en utilisant les paramètres suivants :

- Une seule lecture par échantillon.
- Injection de 100 µl/puits de D-luciférine (Firefly Luciferase Assay Kit, Biotium).
- Lecture durant 10 secondes après un délai de 2 secondes suivant l'injection.

#### **3.6.2 Importance des bassins cellulaires des protéines de l'hôte.**

Des cellules 143B ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une concentration de  $1 \times 10^4$  cellules/puits. Vingt-quatre heures après elles ont été transfectées aux pARNi

contre les protéines cellulaires DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, RAB5A, RAB6A et RAB10 ou avec l'agent de transfection seulement pour 48h. À ce moment, les cellules furent infectées ou pas avec HSV-1(17+)-LoxLuc de type sauvage à une MOI de 10. Pour synchroniser l'infection, les plaques ont été incubées pendant 1h à 4°C. Après, elles ont été transférées pour 1h à 37°C avec faible agitation. Ensuite, l'expérience a été poursuivie comme décrit dans 3.6.1.

### **3.7. Essai de plaques.**

Des cellules 143B ont été transfectées avec des pARNi et infectées avec K26GFP ou HSV-1(17+)-LoxLuc comme décrit ci-dessus. Les surnageants ou les lysats cellulaires ont été titrés sur cellules Vero. Brièvement, 24h avant l'infection des cellules Vero ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les tapis cellulaires ont ensuite été infectés avec les virus intra- ou extracellulaires produits dans des cellules 143B. Pour titrer, des dilutions de log de 10 de chaque échantillon ont été effectuées et les infections ont été réalisées en duplicata, en utilisant habituellement les dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . Après une période d'absorption d'une heure, du DMEM complété contenant 1% d'agarose a été ajouté aux puits et les cellules ont été incubées pendant 3 jours à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Ensuite, le milieu a été enlevé et les tapis cellulaires ont été fixés avec du méthanol froid (-20°C) (Fisher Scientific). Les plaques ont été révélées à l'aide de la teinture de cristal violet 0.1% dans de l'éthanol. Les plaques ont par la suite été comptées et les titres calculés selon la formule [(nbr de plaques/volume utilisé pour l'infection (0.2ml)) x la dilution ou les plaques sont comptées = nbr de plaques/ml]. Dans les cas des titrations des virus intracellulaires (provenant de lysats cellulaires infectés), la concentration totale des protéines dans chaque lysat a été mesurée en parallèle. Pour ce faire, le réactif de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-Rad) a été utilisé selon les instructions du fournisseur et l'absorbance a été mesurée avec un spectrophotomètre.



## 4. Résultats.

### 4.1 Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions.

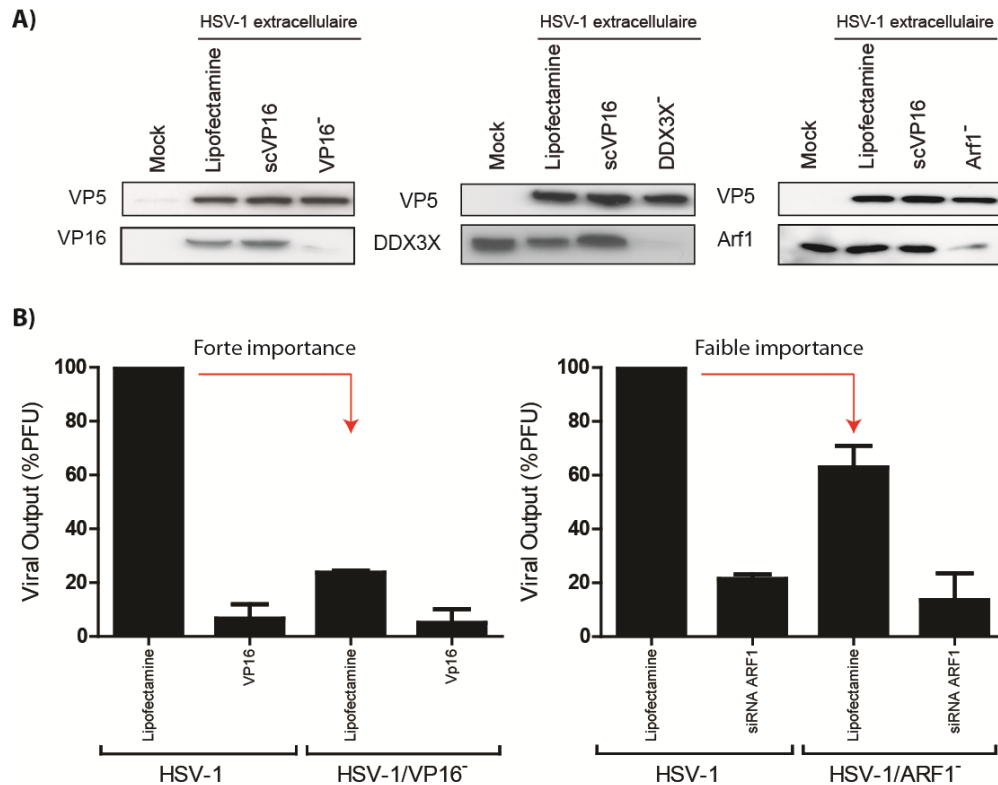
Plusieurs virus incorporent des protéines cellulaires, mais l'importance de cette incorporation est souvent difficile à décortiquer. Les raisons pour lesquelles les protéines cellulaires pourraient être incorporées dans les virions sont diverses. Certaines d'entre elles peuvent simplement être incorporées dans les virions parce qu'elles sont abondantes dans la cellule hôte et/ou elles se retrouvent à l'endroit où le virus s'enveloppe, mais ces protéines ne sont pas utiles au virus. Une deuxième possibilité est qu'elles peuvent être incluses à cause de leur implication au cours de l'assemblage viral, le transport intracellulaire ou la sortie. Dans un tel cas, les protéines ne seraient pas nécessairement importantes pour le lancement du prochain cycle d'infection (pour une réinfection). Et finalement, d'autres protéines peuvent être spécifiquement requises pour promouvoir l'infection des cellules avoisinantes. Dans ce cas, la déplétion de ces protéines des particules virales devrait retarder ou arrêter le cycle de réplication suivant, comme, par exemple, dans le cas des mutants d'HSV-1, déplétés du gène VP16, qui ne croissent pas bien sur des cellules non-complémentaires [162]. Nous avons donc souhaité s'adresser directement à la signification fonctionnelle des protéines de l'hôte associées aux virions. Étant donné que ces protéines sont présentes dans les virions matures, mais aussi dans la cellule, la contribution de ces deux bassins pour le cycle viral a été évaluée de manière indépendante. À cette fin, une approche en deux étapes a été utilisée. Tout d'abord, des virus déplétés de chacune des cibles positives identifiées lors du criblage aux pARNi (tableau 1, en jaune), ont été produits sur cellules traitées aux pARNi ciblant ces quinze protéines. Comme contrôles, les virus ont également été récoltés à partir des cellules traitées juste à la Lipofectamine et à partir des cellules traitées aux pARNi contre la protéine virale transactivatrice des gènes précoces immédiats VP16 ou sa version brouillée, le scVP16. L'efficacité des pARNi à produire des virions extracellulaires déplétés des protéines d'intérêt a ensuite été examinée par immunobuvardage de type Western contre trois des protéines (Figure 7, A). Puisque chacune des conditions produit une certaine quantité de virus, malgré l'inhibition induite par les pARNi (voir les figures 3 et 4 d'annexe 1), chaque stock de virus déplétés a été titré

et utilisé pour réinfecter une nouvelle monocouche de cellules fraîches à une multiplicité d'infection égale.

Dans cette deuxième étape, pour pouvoir distinguer les effets des protéines de l'hôte incorporées dans les virions de celles qui se retrouvent dans les cellules, des cellules contrôles ou des cellules traitées aux pARNi contre les mêmes protéines ont été infectés avec des virus récoltés à partir de cellules traitées uniquement avec la Lipofectamine (soit l'équivalent de virus de type sauvage) ou avec des virus déplétés individuellement des quinze protéines de l'hôte. Puisque les pARNi n'empêchent pas complètement l'incorporation de la protéine ciblée (Figure 7, A) et pour réduire le risque de complémentarité entre les virions normaux et déplétés, les cellules ont été infectées à une MOI de 0,1. Comme prévu, l'infection des cellules traitées aux pARNi contre VP16 avec des virus produits sur des cellules traitées à la Lipofectamine réduit fortement les rendements viraux; ce qui confirme que la protéine virale VP16 régule le cycle de vie du virus (Figure 7, B). Bien que pas aussi étendue, l'infection de cellules normales (des cellules traitées à la Lipofectamine) avec des virus déplétés de VP16 réduit aussi considérablement la production virale. La déplétion simultanée de la protéine VP16 nouvellement exprimée par les virus et celle associée aux virions (infection des cellules traitées aux pARNi contre VP16 avec des virus déplétés de VP16) réduit davantage le rendement viral, confirmant l'importance pour l'infection d'HSV-1 des molécules de VP16 nouvellement exprimées et celles associées aux virions. Ces résultats sont compatibles avec les précédents rapports quant à l'implication du bassin de VP16 associé aux virions dans les étapes précoces du processus d'infection [162]. En contraste avec la forte implication dans le cycle viral de bassin de VP16 incorporé dans les virions, les résultats pour les virus déplétés de la protéine cellulaire ARF1 sont exemplaires pour une faible importance. Étant donné qu'ARF1 joue un rôle dans l'appareil de Golgi et que le virus d'Herpès utilise cette voie de transport pour sa sortie de la cellule-hôte, il est peu probable que l'HSV-1 ait besoin de cette protéine pour réinfecter des nouvelles cellules. Le rendement virale est faiblement diminué quand des cellules normales (traitées juste avec de la Lipofectamine) sont infectées avec des virus déplétés d'ARF1 (Figure 7, B). En accord avec le rôle d'ARF1, dans le cas où cette protéine est absente dans les cellules infectées une très forte diminution de la production virale est observée. Nous avons ensuite appliqué cette stratégie



pour les quinze protéines cellulaires trouvées dans les virions qui étaient positifs dans le criblage aux pARNi. La déplétion des virions matures de huit d'entre elles (DDX3X, MIF, RAB5A, HSPA8, KRT10, Rab6A, RAB10 et YWHAZ) réduit la production virale dans des cellules normales de plus de 50%. Les sept autres cibles sont moins importantes pour le cycle viral (diminution de la production virale de moins de 50%) (Tableau 4). Compte tenu du fait que la viabilité cellulaire des cellules transfectées est semblable à celle des cellules contrôles (Figures 3 de l'annexe 1), cela réaffirme l'implication spécifique des protéines incorporées dans le cycle viral d'HSV-1 plutôt qu'un effet indirect dû à des cellules en mauvais état. Enfin, ces résultats indiquent pour la première fois que les bassins cellulaires de ces protéines et les bassins associés aux virions participent tous les deux dans le cycle de réplication d'HSV-1.



**Figure 7. Importance pour le cycle infectieux d'HSV-1 des protéines cellulaires incorporée dans les virions.** A) Déplétion des protéines cellulaires après un traitement aux pARNi. Des cellules 143B ont été transfectées soit à la Lipofectamine seule, soit aux pARNi contre les contrôles scVP16 et VP16 ou aux ARNi ciblant les protéines cellulaires Arf1, DDX3X. B) Implication des protéines cellulaires associées aux virions matures dans la réplication d'HSV1. Des cellules 143B ont été transfectées à la Lipofectamine ou aux pARNi ciblant individuellement 15 protéines cellulaires et ont été ensuite infectées avec HSV-1 K26GFP. Chaque stock de virus déplétés a été titré sur des cellules Vero et utilisé pour réinfecter

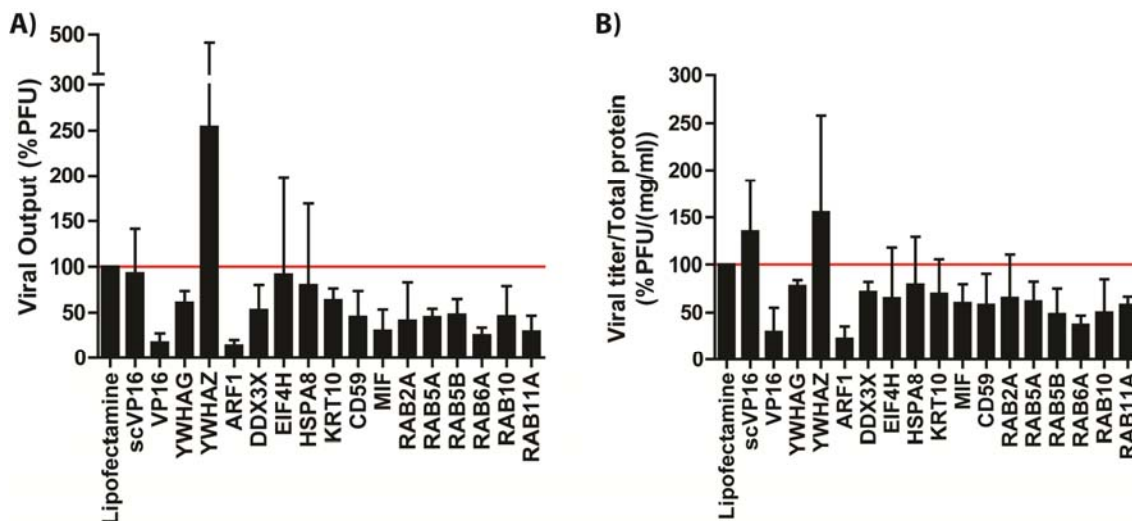
une monocouche de cellules 143B fraîches à une MOI de 0,1. Pendant cette réinfection, des cellules contrôles ou des cellules traitées aux pARNi ont été infectés avec des virus récoltés à partir de cellules traitées uniquement avec la Lipofectamine ou avec des virus déplétés individuellement des quinze protéines de l'hôte. Les histogrammes représentent deux exemples d'une forte importance (50% et plus d'inhibition, voir aussi Tableau 4) et d'une faible importance (moins de 50% d'inhibition) lors de la réinfection. Les données ont été normalisées à la valeur moyenne obtenue pour les échantillons traités seulement avec la Lipofectamine. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes, chacune faite en duplicata.

**Tableau 4: Importance des protéines cellulaires associées aux virions pour la réplication d'HSV-1 lors de l'infection.**

Rendement viral, [% PFU (DS)]				
Présence dans la cellule:		+	+	-
Présence dans les virions:		+	-	+
<b>Contrôles</b>				
Lipofectamine		100		
scVP16			137 (41)	191 (70)
VP16			37 (24)	6 (5)
<b>Protéines cellulaires</b>				
50% et plus d'inhibition	DDX3X		24 (0,1)	40 (24)
	MIF		27 (9)	15 (0,1)
	RAB5A		33 (10)	42 (24)
	HSPA8		40 (11)	22 (9)
	KRT10		45 (20)	66 (4)
	RAB6A		45 (26)	44 (18)
	RAB10		47 (12)	31 (19)
	YWHAZ		49 (3)	74 (9)
Moins de 50% d'inhibition	RAB5B		52 (30)	66 (11)
	RAB2A		55 (6)	73 (8)
	CD59		58 (12)	49 (14)
	YWHAG		58 (13)	73 (9)
	ARF1		63 (8)	21 (2)
	eIF4H		68 (8)	50 (10)
	RAB11A		74 (38)	58 (18)

#### **4.2. Impact de la déplétion du bassin cellulaire des protéines de l'hôte sur la production des virions intracellulaires.**

Afin de commencer à décortiquer l'avantage que pourrait avoir le virus à incorporer des protéines cellulaires, et comme première tentative pour trouver leurs rôles dans le cycle viral, nous nous sommes intéressés aux quantités des virus infectieux à l'intérieur des cellules. La titration des virus contenus dans les cellules infectées devrait en effet permettre de déterminer à quel endroit l'infection est bloquée et éventuellement le site d'action des protéines ayant un impact sur la relâche de virus. Pour évaluer les effets de la déplétion individuelle des 15 protéines cellulaires sur les quantités intracellulaires d'HSV-1 infectieux, des cellules 143B ont été transfectées aux pARNi pour 48h et infectés avec HSV-1 K26GFP (MOI 5) pour 24h. Les cellules infectées ont été collectées et une titration sur des cellules Vero a été effectuée par la suite. Des grandes variations ont été malheureusement observées (barres d'erreurs dans Figure 8, A). Puisque que nous titrons les fractions intracellulaires, nous avons supposé que ces variations sont dues à la quantité de cellules infectées, ce qui est pertinent puisque le virus lyse, éventuellement, la cellule. Pour adresser cette question nous avons normalisé les titres viraux en fonction de la quantité totale de protéines mesurées dans chaque lysat (Figure 8, B). Les variations dans les titres ont alors sensiblement diminué (comparer Figure 8, A et B). Pris dans leur ensemble, ces données démontrent que, dans la plupart des cas, les quantités de virus infectieux à l'intérieur de la cellule ne sont pas significativement différentes du contrôle Lipofectamine. Dans les cas des cellules traitées avec des pARNi contre les protéines VP16, Arf1, Rab5b, Rab6a, Rab10 et Rab11a, on observe une diminution de 50% ou plus de la quantité de virus infectieux, suggérant des rôles de ses protéines dans les étapes d'assemblage du virus ou en amont de celles-ci. En ce qui concerne la protéine 14-3-3  $\zeta$  (YWHAZ), on observe une légère accumulation de virus intracellulaire suggérant que la déplétion de cette protéine ralenti la sortie d'HSV-1.



**Figure 8. Impact de la déplétion des protéines cellulaires sur la production des virions intracellulaires.** Des cellules 143B ont été transfectées avec des pARNi ciblant 15 protéines cellulaires et infectées avec K26GFP, les lysats cellulaires ont été collectés et re-suspendus dans du PBS. Les particules virales intracellulaires ont été libérées en craquant les cellules avec 3 cycles de gels-dégels et des titrations sur des cellules Vero ont été effectuées. A) Titres viraux intracellulaires. B) Titres viraux normalisés en fonction des quantités totales de protéines. Après la titration les lysats cellulaires ont été utilisés pour mesurer les quantités totales des protéines en utilisant le réactif de Bradford. Les données ont été normalisées à la valeur moyenne obtenue pour les échantillons traités seulement avec la Lipofectamine. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes, chacune fait en duplicata.

#### 4.3. Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures pour l'entrée d'HSV-1.

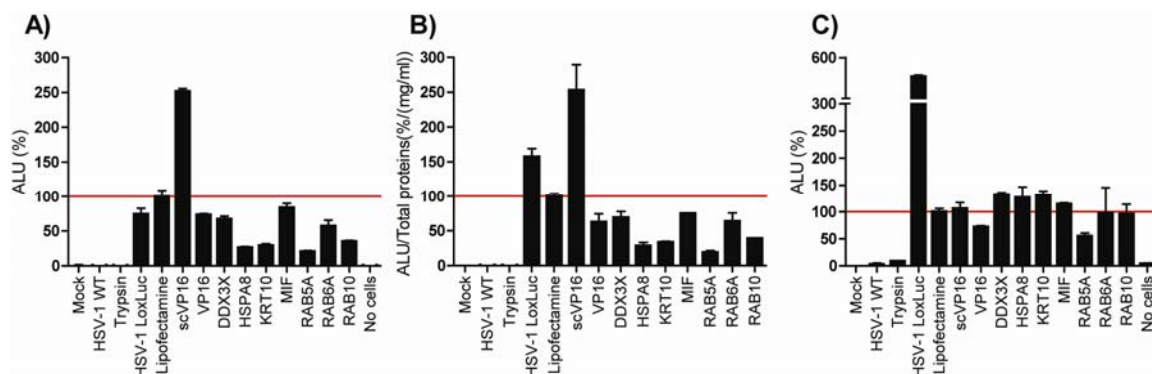
D'un côté, lors des essais de réinfections avec des virus déplétés des protéines DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A et Rab10 nous avons observé une diminution du rendement viral extracellulaire de plus de 50%. [Pour des raisons techniques les virus déplétés de la protéine YWHAG n'ont pas été examinés dans les expériences d'entrée d'HSV-1 (voir section 3.6.1)]. D'un autre côté, les résultats des titrations intracellulaires suggèrent au moins un ralentissement du cycle viral quand l'expression cellulaire de ces protéines est inhibée. Tout ça nous a emmené à émettre l'hypothèse que ces sept protéines sont possiblement impliquées dans les étapes précoces du cycle viral et plus particulièrement dans l'entrée du virus. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis au

point une méthode d'analyse de l'entrée, qui mesure la luminosité émise par des mutants d'HSV-1 codant pour une luciférase et déplétés d'une des sept protéines cellulaires. Des cellules 143B ont donc été transfectées juste à la Lipofectamine ou aux pARNi contre scVP16, VP16, DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A et Rab10 et après 48h ont été infectées avec HSV-1(17+)-LoxLuc à une MOI de 5. Les surnageants des virus déplétés ont été collectés et titrés sur des cellules Vero. Ces surnageants, par la suite, ont été utilisés pour infecter de nouvelles cellules 143B à une MOI de 10. Pour synchroniser l'infection, les plaques ont été incubées pendant 1h à 4°C. La luminescence a été détectée après 1h d'incubation à 37°C. Comme contrôle négatif d'entrée, les virus étaient traités pendant 5 minutes à 37°C à la trypsine 0,25%. Après ce traitement, les glycoprotéines virales nécessaires pour l'entrée du virus sont digérées par la trypsine. Pour contrôler la sensibilité de la détection de luminescence par le luminomètre, les cellules ont été infectées avec HSV-1(17+)-LoxWT, qui ne code pas pour une luciférase et qui donc n'émet pas de luminescence. L'absence de luminescence émise par le stock du virus HSV-1(17+)-LoxLuc extracellulaire utilisé (Figure 9, A et C, la barre «No cells»), nous assure que la protéine de la luciférase n'est pas incorporée dans les virions.

Mes résultats préliminaires suggèrent l'implication dans l'entrée d'HSV-1 d'au moins 3 à 4 protéines (HSPA8, KRT10, Rab5A et Rab10, Figure 9). Lors des titrations des fractions intracellulaires, nous avons observé que les variations dans les titres dépendent de la quantité de cellules infectées. Cela nous a obligé à vérifier la même fonction dans les essais d'entrée. En comparant les résultats des lectures et les résultats en fonction des quantités totales des protéines normalisées (Figure 9, A et B), on n'observe pas de différences importantes; ce qui suggère que les effets des virus déplétés sur l'entrée ne sont pas dûs aux différences au niveau des quantités des cellules infectées.

Ensuite, nous nous sommes demandé si l'absence de ces sept protéines dans les cellules pouvait aussi empêcher l'entrée du virus. Autrement dit, est-ce que la simple présence de ces protéines dans les virus est suffisante pour la réalisation d'une entrée normale dans les cellules hôtes? Pour répondre à cette question des cellules 143B ont été transfectées aux pARNi contre les protéines cellulaires DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A et Rab10. Quarante-huit heures après elles étaient infectées avec HSV-1(17+)-LoxLuc et incubée pendant 1h à 4°C. La luminescence a été détectée après 1h

d'incubation à 37°C. Les résultats préliminaires démontrent, sauf pour Rab5a, que la présence dans les virus de ces protéines est suffisante pour que le virus entre librement dans les cellules (Figure 9, C). Dans le cas de Rab5A, on observe une diminution du signal de luminescence, suggérant que HSV-1 entrerait dans les cellules 143B par la voie d'endocytose.



**Figure 9. Rôles des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures dans l'entrée d'HSV-1.** Des virus déplétés ont été produits après une infection avec HSV-1(17+)-LoxLuc des cellules 143B transfectées aux ARNi contre DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A et Rab10 et titrés sur des cellules Vero. Ces virus ont été utilisés pour infecter des cellules 143B fraîches. La luminescence a été détectée après une synchronisation d'une heure à 4°C et une d'incubation d'une heure à 37°C. À l'intérieur de chaque expérience les essais ont été faits en duplicatas. A) Importance des protéines cellulaires associées aux virions matures. Histogramme des résultats d'un essai. B) Importance des protéines cellulaires associées aux virions matures. Mêmes résultats que dans A), normalisés en fonction des quantités totales des protéines dans chaque duplicata. C) Importance des protéines présentes dans les cellules hôtes. Des cellules transfectées pour 48h aux ARNi contre les sept protéines cellulaires ont été infectées avec HSV-1(17+)-LoxLuc. Comme contrôle négatif d'entrée, les virus étaient traités pendant 5 minutes à 37°C à la trypsine 0,25%. Contrôle négatif de luminescence – infection avec HSV-1-WT. La luminescence a été détectée après une synchronisation d'une heure à 4°C et une d'incubation d'une heure à 37°C. Les données ont été normalisées à la valeur moyenne obtenue pour les échantillons traités seulement avec la Lipofectamine. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des moyens des duplicatas d'une expérience.

## 5. Discussion.

Les virus interagissent avec nombreux facteurs cellulaires pour compléter leur cycle de vie. Récemment, nous avons signalé que 49 protéines cellulaires étaient incorporées dans les particules virales extracellulaires matures d'HSV-1 [1]. Étant donné que certaines de ces protéines peuvent jouer des rôles pivots au cours du cycle de vie du virus, ils constituent des cibles de choix pour identifier et caractériser des nouvelles interactions hôte-pathogène dans le contexte d'une infection à HSV-1.

Pour cibler les protéines qui seraient pertinentes pour le cycle viral de l'Herpès, notre laboratoire a effectué un criblage aux pARNi (Annexe 1). Ce criblage s'est avéré sensible, rapide et linéaire (Figures 2 et 3 de l'Annexe 1). Étant donné que le dosage basé sur la GFP utilisé dans le criblage aux pARNi détecte les particules virales totales plutôt que les virions infectieux, les cibles positives ont été confirmées par des essais de plaques classiques permettant de mesurer les titres viraux suite au traitement aux pARNi. Les données de fluorimétrie ainsi que les essais de plaques ont démontré qu'au moins 15 des protéines testées sont impliquées dans le cycle de réplication de HSV-1 en culture cellulaire (Figures 3 et 4 de l'Annexe 1).

Les protéines cellulaires avec un effet sur HSV-1 trouvées dans cette étude sont impliquées dans des voies qui sont, très probablement, importantes pour le processus d'infection. Parmi elles, ont été identifiées des GTPases Rab et plusieurs autres composants de transport intracellulaire ainsi que des protéines impliquées dans la signalisation, dont certaines ont déjà été démontrées comme étant nécessaires pour la production de différents virus. Par exemple, il a été récemment démontré que Rab6A, est nécessaire pour le trafic cellulaire de la protéine virale pp150 et l'assemblage efficace du virus d'HCMV [163], tandis que Rab11 module le transport intracellulaire à la membrane plasmique du génome du virus de la grippe [164]. Aussi, Rab1 et Rab43 sont impliquées dans l'enveloppement secondaire d'HSV-1 [114]. Il est donc fort possible que certaines des protéines identifiées dans la présente étude soient impliquées dans les nombreux événements de transport qui se produisent au cours d'une infection avec HSV-1. De plus, 6 des 15 protéines; 14-3-3  $\zeta$  /  $\delta$  (YWHAZ), Arf1 (ARF1), DDX3X, eIF4H, la kératine 10 (KRT10) et CD59 ont déjà été trouvées dans des particules virales d'HSV-1, d'HCMV, de KSHV et/ou de PRV [124, 126,

165, 166], ce qui suggère qu'elles pourraient avoir un rôle commun à travers la famille des herpesvirus.

### **5.1 Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions.**

Des nombreuses études rapportent l'incorporation de protéines de l'hôte dans les virions matures mais très peu abordent l'importance que peuvent avoir ces protéines dans le cycle virale. Pour vérifier ça, nous avons déplété les protéines des virions matures extracellulaires en utilisant des petits ARN d'interférence (Figure 7, A). Par la suite, nous avons utilisé ces virus déplétés pour réinfecter des cellules normales. Cette méthode nous a permis d'identifier pour la première fois 8 protéines dont l'absence dans les virions réduit la production virale d'au moins 50% (Tableau 4), soulignant ainsi la relation étroite entre le virus et son hôte. La déplétion des virions de certaines protéines de l'hôte (par exemple : Arf1, eIF4H et Rab11A) cause peu ou aucun impact sur la production virale. Vraisemblablement, Arf1 et Rab11A sont acquis au TGN au cours de l'assemblage final d'HSV-1 et ne sont pas importantes pour réinfecter des cellules. Les résultats obtenus pour les virions déplétés de la protéine eIF4H sont plutôt surprenants compte tenu que cette protéine est connue pour interagir avec la protéine virale Vhs (UL41) rapidement après l'entrée d'HSV-1 [118]. Bien qu'il soit possible que cette protéine soit incorporée en raison de son abondance et/ou de sa localisation dans les sites d'assemblage, il se peut que la forme d'eIF4H incorporée dans les virions ne soit pas fonctionnelle et qu'elle doive être activée. En effet, des résultats d'immunobuvardage de type Western sur des virus extracellulaires démontrent que dans les virions incorporent préférentiellement deux formes d'eIF4H qui ne sont pas très abondantes dans les lysats cellulaires non-infectés (résultats non-publiés). De plus, il a été rapporté qu'une liaison à d'autres facteurs tels que le facteur eIF4F qui lie le complexe de la coiffe et qui n'a pas été détecté dans les virions d'HSV-1 [1] est également nécessaire pour la dégradation des ARNm induite par Vhs [167]. Par conséquent, le bassin d'eIF4H associé aux virions seul peut ne pas être suffisant pour effectuer son rôle dans l'infection d'HSV-1, mais il pourrait être nécessaire au virus pour recruter d'autres facteurs et ainsi de faciliter la traduction de ses gènes.



Il existe des nombreuses évidences de l'implication de l'ARN-hélicase DDX3X dans les cycles de vie de plusieurs virus aux génomes d'ARN ou d'ADN (Tableau 2, [135, 167-170]). Nos résultats démontrent que la fraction de DDX3X associée aux virions s'avère aussi importante pour l'HSV-1 (Tableau 4). Nos résultats suggèrent que cette protéine puisse représenter un facteur commun nécessaire pour l'infection des cellules hôtes par différents virus.

## **5.2. Impact de la déplétion de bassin cellulaire des protéines de l'hôte sur la production des virions intracellulaires.**

Dans cette étude, nous avons démontré l'importance de plusieurs protéines cellulaires incorporées dans les virions matures d'HSV-1. Cependant, le stade du cycle viral affecté par l'absence de ces protéines cellulaires n'est pas clair. Pour adresser ce point, des virions intracellulaires ont été récoltés à partir des cellules prétraitées aux pARNi ciblant individuellement les 15 protéines cellulaires et ont été titrés sur des cellules Vero. Malgré les variations dans les titres, vraisemblablement dépendant de la quantité de cellules infectées, la figure 8 montre que la déplétion de ces protéines inhibe l'HSV-1 entre 20% et 80% avec plus de 50% dans les cas des protéines Arf1, Rab5B, Rab6A, Rab10 et Rab11A. Étant donné que ces protéines jouent des rôles dans le trafic des protéines et des vésicules dans la cellule (Tableau 2) et que pour son assemblage et sortie le virus d'Herpès utilise les mêmes voies de transportation, il est possible que ces protéines ont un effet très indirect lorsqu'elles sont déplétées de la cellule-hôte. Par contre, leur déplétion du virus donne un résultat plus clair. Nos résultats démontrent une légère diminution (entre 20% et 35%) de la formation des particules virales intracellulaires infectieuses à 24 heures après l'infection (le moment de la récolte et de la titration sur des cellules Vero) lors d'une déplétion de DDX3X, YWHAG, EIF4H, HSPA8, KRT10, MIF, CD59 et RAB2A (Figure 8). En comparant les résultats montrés à la figure 4 de l'Annexe 1 avec ceux de la figure 8, dans le cas des virus déplétés de ces 8 protéines, l'inhibition des titres viraux extracellulaires est plus importante que celle des titres viraux intracellulaires. Ces résultats suggèrent, que le manque de ces protéines entraîne un ralentissement dans le cycle viral d'HSV-1 ou un blocage des virions enveloppés à l'intérieur de la cellule. Effectivement, après un examen plus approfondi, en absence de DDX3X, nous avons observé un retard de l'expression des

protéines virales immédiates précoces ICP0 et ICP4 (Figure 9 de l'Annexe 1). Cela, et aussi l'observation que l'incorporation de ces protéines dans les virions facilite l'infection d'HSV-1, est compatible avec des rôles pour ces protéines au début de l'infection.

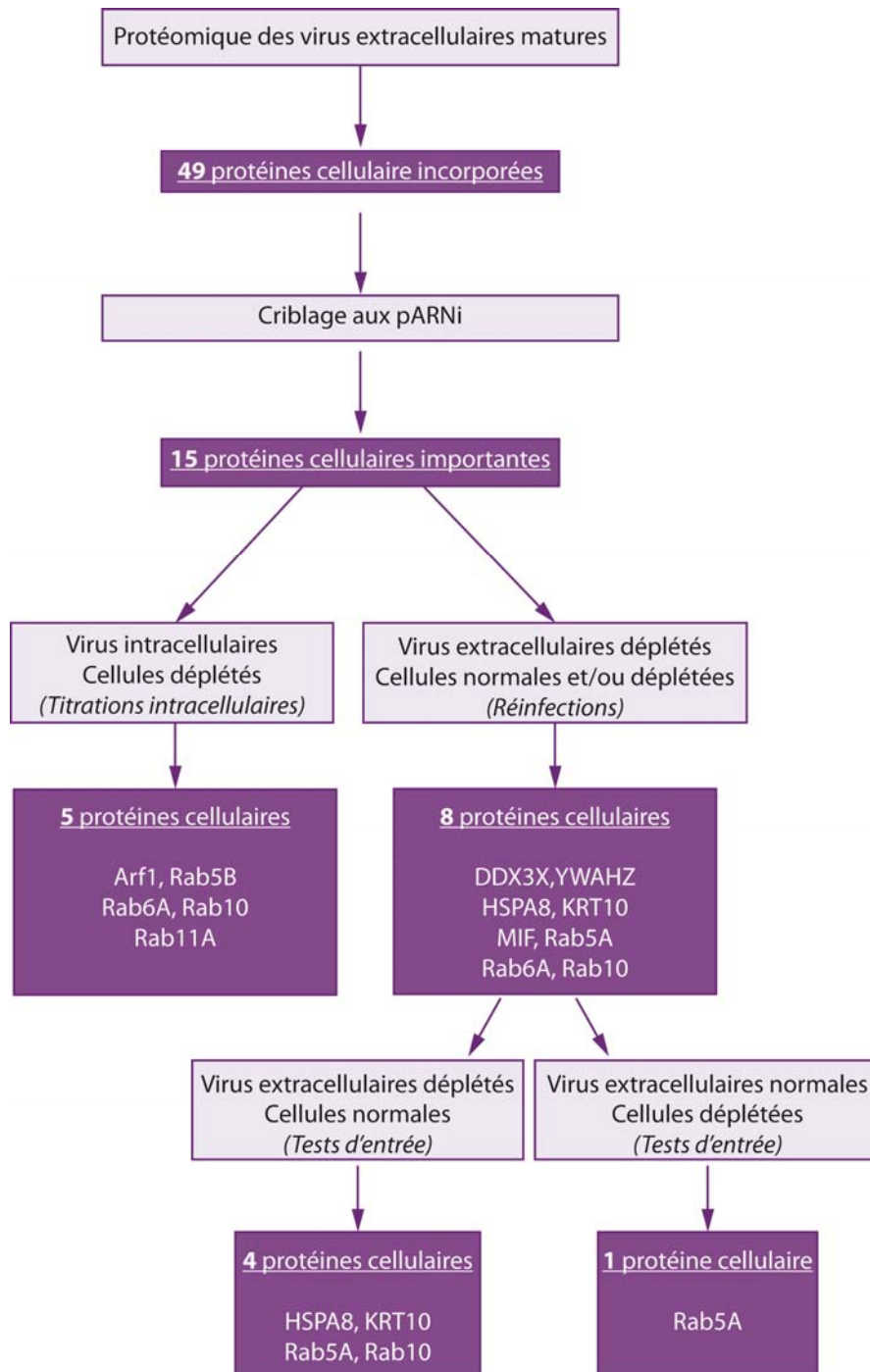
### **5.3. Importance des protéines cellulaires incorporées dans les virions matures pour l'entrée d'HSV-1.**

Nos résultats démontrent que la déplétion des virus extracellulaires des protéines DDX3X, HSPA8, KRT10, MIF, Rab5A, Rab6A et Rab10 cause une inhibition des titres viraux de plus de 50% lors d'une réinfection (Tableau 4). Une telle inhibition de la production des virus extracellulaires pourrait être expliquée avec un problème d'entrée du virus. Selon notre hypothèse, si les virus ont des difficultés à pénétrer la cellule-hôte, leur rendement à la fin de l'infection sera aussi négativement affecté. Pour tester ce scénario, nous avons mesuré la luminosité émise par des virus HSV-1(17+)-LoxLuc, individuellement déplétés de ces sept protéines cellulaires. Les résultats préliminaires, démontrent l'implication dans l'entrée d'HSV-1 d'au moins 3 à 4 protéines (HSPA8, KRT10, Rab5A et Rab10, Figure 9). Dans la littérature, il est connu que certaines d'entre elles sont impliquées dans les étapes d'entrée de plusieurs virus de type enveloppé ou non [168-170]. Par exemple, HSPA8 permet la fusion cellulaire et la formation des syncytia cellulaires par le virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1), un virus aussi enveloppé [139]. À 6 heures après une infection avec HSV-1, HSPA8 et d'autres protéines chaperonnes, sont retenues dans des foyers distincts dans les noyaux des cellules infectées [138]. Aussi, en concordance avec nos résultats (Figure 9, A et C), Rab5, un composé de la machinerie d'endocytose, s'avère nécessaire pour plusieurs virus utilisant cette voie d'entrée (Tableau 2). Bien que la reproductibilité des résultats doive être vérifiée, les données actuelles indiquent que certaines protéines sont très probablement requises pour l'entrée d'HSV-1 dans les cellules 143B.

## 6. Conclusion et perspectives

La présente étude met en évidence la relation très étroite entre HSV-1 et son hôte. Les résultats présentés ici démontrent la grande contribution des protéines cellulaires dans le cycle viral de l'Herpès simplex de type 1. Afin d'augmenter leur virulence, les virus intègrent certaines protéines de l'hôte à leurs virions matures.

Dans la présente étude, nous avons dévoilé l'implication de 15 protéines cellulaires dans le cycle de réplication d'HSV-1 (Figure 10). Après avoir confirmé l'implication de ces protéines dans le cycle du virus et après avoir démontré qu'il est possible d'évaluer l'importance des fractions incorporées de ces protéines sur la production virale, il serait intéressant de s'attarder à leurs rôles. Afin de mieux comprendre à quelle étape du cycle de vie du virus ces protéines sont nécessaires, nous avons vérifié les quantités des virus intracellulaires produits à partir des cellules déplétées des protéines ciblées. Nous avons trouvé au moins 7 protéines cellulaires avec un effet plus prononcé sur la réplication d'HSV-1, ce qui nous a porté à débiter une série de tests plus approfondis sur l'implication de ces protéines dans l'entrée du virus (Figure 10). Bien que, dans les tests préliminaires, ces protéines semblent agir sur l'entrée du virus, une amélioration des conditions expérimentales devrait être envisagée, afin de pouvoir distinguer les différentes étapes de l'entrée, notamment, l'attachement de virions à la membrane plasmique, la fusion, le transport jusqu'au noyau et l'expression des gènes viraux. Pour le moment, nous ne savons pas de quelle façon les protéines cellulaires sont impliquées dans ces processus. Malgré les nombreuses évidences que nos quinze cibles soient impliquées dans les cycles de vie de plusieurs virus et que, dans certains cas, ses rôles commencent à être résolus (Tableau 2, [135, 172-175]), les mécanismes d'action exacts dans les infections par HSV-1 restent loin d'être connus et les résultats suggèrent que d'autres cibles directes ou indirectes doivent exister. Il faut donc nous concentrer sur la caractérisation des rôles des protéines au niveau moléculaire et sur l'identification de leurs partenaires pour pouvoir mieux comprendre leur implication dans la biologie de l'Herpès. Ces connaissances pourraient non seulement mener au développement de produits antiviraux, mais aussi contribuer à une meilleure compréhension des rôles de ces protéines dans la cellule saine, puisque, dans certains cas, ceux-ci restent encore nébuleux.



**Figure 10. Résumé schématique de l'ordre des techniques utilisées dans cette étude et le nombre respectif des protéines cellulaires avec un effet important sur la production virale.**

## Bibliographie

1. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe, *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8605-18.
2. Andrew J, D., *Herpesvirus systematics*. Veterinary Microbiology, 2010. **143**(1): p. 52-69.
3. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields' virology*. 5th ed. 2007, Philadelphia: Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 1 texte électronique.
4. Roizman, B. and R.J. Whitley, *The nine ages of herpes simplex virus*. Herpes, 2001. **8**(1): p. 23-7.
5. Vidal, J., *Ann Dermatol Syphiligr*. 1873. **1**(350).
6. Gruter, W., *Das herpesvirus, seine atiologische und klinische bedeutung*. Munch Med Wschr, 1924. **71**: p. 1058.
7. Schneweiss, K., *Untersuchungen zur typendifferenzierung des herpesvirus hominis*. Z Immuno-Forsch, 1962. **124**: p. 24-28.
8. Roizman, B., G.S. Borman, and M.K. Rousta, *Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus*. Nature, 1965. **206**(991): p. 1374-5.
9. Sydiskis, R.J. and B. Roizman, *Polysomes and protein synthesis in cells infected with a DNA virus*. Science, 1966. **153**(731): p. 76-8.
10. Morgan, C., H.M. Rose, and B. Mednis, *Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry*. J Virol, 1968. **2**(5): p. 507-16.
11. Spear, P.G. and B. Roizman, *The proteins specified by herpes simplex virus. I. Time of synthesis, transfer into nuclei, and properties of proteins made in productively infected cells*. Virology, 1968. **36**(4): p. 545-55.
12. Morgan, C., H.S. Rosenkranz, and B. Mednis, *Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Entry and uncoating of adenovirus*. J Virol, 1969. **4**(5): p. 777-96.
13. Roizman, B., et al., *Variability, structural glycoproteins, and classification of herpes simplex viruses*. Nature, 1970. **227**(5264): p. 1253-4.
14. Spear, P.G. and B. Kellejmroian, *Proteins spcified by herpes simplex virus. II. Viral glycoprotins associated with cellular membranes*. J Virol, 1970. **5**(2): p. 123-31.
15. Gibson, W. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1044-52.
16. Gibson, W. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1044-52.
17. Heine, J.W., P.G. Spear, and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. VI. Viral proteins in the plasma membrane*. J Virol, 1972. **9**(3): p. 431-9.
18. Spear, P.G. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion*. J Virol, 1972. **9**(1): p. 143-59.
19. Benyesh-Melnick, M., et al., *Viral gene functions expressed and detected by temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1975. **39 Pt 2**: p. 731-46.

20. Frenkel, N., et al., *Anatomy of herpes simplex virus DNA. III. Characterization of defective DNA molecules and biological properties of virus populations containing them.* J Virol, 1975. **16**(1): p. 153-67.
21. Roizman, B., *Herpes simplex virus: aspects of structure and regulation of viral RNA and protein synthesis.* pp. 355-95. In: Kolber AR, ed. Tumor virus-host cell interaction. New York, Plenum Press,, 1975.
22. Roizman, B., *Molecular organization and expression of herpes simplex DNA.* Adv Pathobiol, 1976. **5**: p. 54-60.
23. Murchie, M.J. and D.J. McGeoch, *DNA sequence analysis of an immediate-early gene region of the herpes simplex virus type 1 genome (map coordinates 0.950 to 0.978).* J Gen Virol, 1982. **62**(Pt 1): p. 1-15.
24. Guo, H., et al., *Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress.* Protein Cell, 2010. **1**(11): p. 987-98.
25. Karasneh, G.A. and D. Shukla, *Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success.* Virol J, 2011. **8**: p. 481.
26. Rajcani, J. and V. Durmanova, *Developments in herpes simplex virus vaccines: old problems and new challenges.* Folia Microbiol (Praha), 2006. **51**(2): p. 67-85.
27. Dasgupta, G., et al., *New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield.* Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(8): p. 1023-35.
28. Homa, F.L. and J.C. Brown, *Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus.* Rev Med Virol, 1997. **7**(2): p. 107-122.
29. Lehman, I.R. and P.E. Boehmer, *Replication of Herpes Simplex Virus DNA.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(40): p. 28059-28062.
30. McGeoch, D.J., et al., *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1.* J Gen Virol, 1988. **69**(Pt 7): p. 1531-74.
31. McGeoch, D.J., et al., *Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1.* Nucleic Acids Res, 1986. **14**(4): p. 1727-45.
32. Rajčáni, J., V. Andrea, and R. Ingeborg, *Peculiarities of Herpes Simplex Virus (HSV) Transcription: An overview.* Virus Genes, 2004. **28**(3): p. 293-310.
33. van Genderen, I.L., et al., *The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei.* Virology, 1994. **200**(2): p. 831-6.
34. van Meer, G. and K. Simons, *Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions.* EMBO J, 1982. **1**(7): p. 847-52.
35. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe, *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress.* J Virol, 2005. **79**(14): p. 8847-60.
36. Heldwein, E. and C. Krummenacher, *Entry of herpesviruses into mammalian cells.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(11): p. 1653-1668.
37. Melchjorsen, J., *Sensing herpes: more than toll.* Reviews in Medical Virology, 2011: p. n/a-n/a.
38. Reske, A., et al., *Understanding HSV-1 entry glycoproteins.* Reviews in Medical Virology, 2007. **17**(3): p. 205-215.
39. Chouljenko, D.V., et al., *Functional Hierarchy of Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) Viral Glycoproteins in Cytoplasmic Virion Envelopment and Egress.* Journal of Virology, 2012.

40. Johnson, D.C. and J.D. Baines, *Herpesviruses remodel host membranes for virus egress*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 382-94.
41. Farnsworth, A., et al., *Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10187-92.
42. Zhang, J., et al., *Early, active and specific localization of HSV-1 gM to nuclear membranes*. J Virol, 2009. **83**(24): p. 12984-97.
43. Ren, Y., et al., *Glycoprotein M is Important for the Efficient Incorporation of Glycoprotein H/L into HSV-1 particles*. J Gen Virol, 2011.
44. Kelly, B.J., et al., *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virus Res, 2009. **145**(2): p. 173-86.
45. Asai, R., et al., *Identification of proteins directly phosphorylated by UL13 protein kinase from herpes simplex virus 1*. Microbes Infect, 2007. **9**(12-13): p. 1434-8.
46. Kato, A., et al., *Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1476-86.
47. Tanaka, M., et al., *The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: the activity is not essential for optimal expression of UL41 and ICP0*. Virology, 2005. **341**(2): p. 301-12.
48. Frame, M.C., et al., *Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3*. J Gen Virol, 1987. **68**(Pt 10): p. 2699-704.
49. Purves, F.C., et al., *Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture*. J Virol, 1987. **61**(9): p. 2896-901.
50. Poon, A.P., H. Gu, and B. Roizman, *ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 9993-8.
51. Mou, F., T. Forest, and J.D. Baines, *US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6459-70.
52. Kato, A., et al., *Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase Us3 and Major Tegument Protein UL47 Reciprocally Regulate Their Subcellular Localization in Infected Cells*. J Virol, 2011. **85**(18): p. 9599-613.
53. Cook, W.J., et al., *Regulation of neighboring gene expression by the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene*. Virology, 1996. **218**(1): p. 193-203.
54. Schlieker, C., et al., *A deubiquitinating activity is conserved in the large tegument protein of the herpesviridae*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15582-5.
55. Kattenhorn, L.M., et al., *A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 547-57.
56. Everett, R.D., M.L. Parsy, and A. Orr, *Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4963-77.
57. Bergman, A.-C., P.O. Nyman, and G. Larsson, *Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1*. FEBS Letters, 1998. **441**(2): p. 327-330.

58. Bergman, A.C., P.O. Nyman, and G. Larsson, *Kinetic properties and stereospecificity of the monomeric dUTPase from herpes simplex virus type 1*. FEBS Lett, 1998. **441**(2): p. 327-30.
59. Lee, J.H., et al., *Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1*. Virology, 2008. **378**(2): p. 347-54.
60. Fossum, E., et al., *Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks*. PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000570.
61. Bowman, B.R., et al., *Structure of the herpesvirus major capsid protein*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 757-65.
62. Wingfield, P., et al., *Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus*. J Virol, 1997. **71**: p. 8955 - 8961.
63. Newcomb, W.W., et al., *The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10923-32.
64. Cardone, G., et al., *Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography*. Virology, 2007. **361**(2): p. 426-34.
65. Albright, B.S., et al., *Disulfide Bond Formation in the HSV-1 UL6 Protein is Required for Portal Ring Formation and Genome Encapsidation*. J Virol, 2011.
66. Davison, M.D., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1*. J Gen Virol, 1992. **73**(Pt 10): p. 2709-13.
67. Trus, B.L., et al., *The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly*. J Mol Biol, 1996. **263**(3): p. 447-62.
68. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation*. J Mol Biol, 1996. **263**(3): p. 432-46.
69. Reske, A., et al., *Understanding HSV-1 entry glycoproteins*. Rev Med Virol, 2007. **17**(3): p. 205-15.
70. Heldwein, E.E. and C. Krummenacher, *Entry of herpesviruses into mammalian cells*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1653-68.
71. Akhtar, J. and D. Shukla, *Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry*. FEBS Journal, 2009. **276**(24): p. 7228-7236.
72. Geraghty, R.J., et al., *Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1618-20.
73. Whitbeck, J.C., et al., *Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry*. J Virol, 1997. **71**(8): p. 6083-93.
74. Montgomery, R.I., et al., *Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family*. Cell, 1996. **87**(3): p. 427-36.
75. Shukla, D., et al., *A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry*. Cell, 1999. **99**(1): p. 13-22.
76. Atanasiu, D., et al., *Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB*. J Virol, 2010. **84**(23): p. 12292-9.
77. Glauser, D.L., A.-S. Kratz, and P.G. Stevenson, *Herpesvirus Glycoproteins Undergo Multiple Antigenic Changes before Membrane Fusion*. PLoS ONE, 2012. **7**(1): p. e30152.



78. Dohner, K., et al., *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2795-809.
79. Sodeik, B., M.W. Ebersold, and A. Helenius, *Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus*. J Cell Biol, 1997. **136**(5): p. 1007-21.
80. Alwine, J.C., W.L. Steinhardt, and C.W. Hill, *Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEP-2 and KB cells*. Virology, 1974. **60**(1): p. 302-7.
81. Batterson, W. and B. Roizman, *Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes*. J Virol, 1983. **46**(2): p. 371-7.
82. Costanzo, F., et al., *Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B*. J Virol, 1977. **21**(3): p. 996-1001.
83. Spector, D., F. Purves, and B. Roizman, *Role of alpha-transinducing factor (VP16) in the induction of alpha genes within the context of viral genomes*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3504-13.
84. Jones, P.C. and B. Roizman, *Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated*. J Virol, 1979. **31**(2): p. 299-314.
85. Maul, G.G., A.M. Ishov, and R.D. Everett, *Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1*. Virology, 1996. **217**(1): p. 67-75.
86. Makhov, A.M., et al., *Visualization of the unwinding of long DNA chains by the herpes simplex virus type 1 UL9 protein and ICP8*. J Mol Biol, 1996. **258**(5): p. 789-99.
87. Arana, M.E., et al., *Modulation of the herpes simplex virus type-1 UL9 DNA helicase by its cognate single-strand DNA-binding protein, ICP8*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6840-5.
88. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *Herpes simplex virus type 1 ICP8: helix-destabilizing properties*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 711-5.
89. Boehmer, P.E. and A.V. Nimmonkar, *Herpes virus replication*. IUBMB Life, 2003. **55**(1): p. 13-22.
90. Jacob, R.J., L.S. Morse, and B. Roizman, *Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA*. J Virol, 1979. **29**(2): p. 448-57.
91. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 167-80.
92. Mettenleiter, T.C. and T. Minson, *Egress of alphaherpesviruses*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1610-1; author reply 1611-2.
93. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.
94. Remillard-Labrosse, G., et al., *Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1074-83.

95. Malhotra, V. and F. Campelo, *PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
96. Lachmann, R., *Herpes simplex virus latency*. Expert Rev Mol Med, 2003. **5**(29): p. 1-14.
97. Mellerick, D.M. and N.W. Fraser, *Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state*. Virology, 1987. **158**(2): p. 265-75.
98. Wagner, E.K., et al., *Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons*. Journal of Virology, 1988. **62**(4): p. 1194-1202.
99. Goldenberg, D., et al., *The abundant latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 are bound to polyribosomes in cultured neuronal cells and during latent infection in mouse trigeminal ganglia*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 2897-904.
100. Mador, N., et al., *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5067-75.
101. Shen, W., et al., *Two small RNAs encoded within the first 1.5 kb of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) can inhibit productive infection, and cooperate to inhibit apoptosis*. J Virol, 2009.
102. Held, K. and T. Derfuss, *Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia—current overview*. Journal of NeuroVirology, 2011. **17**(6): p. 518-527.
103. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
104. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-251.
105. Xia, H., et al., *siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo*. Nat Biotech, 2002. **20**(10): p. 1006-1010.
106. Agrawal, N., et al., *RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003. **67**(4): p. 657-685.
107. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.
108. Brass, A.L., et al., *Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen*. Science, 2008. **319**(5865): p. 921-6.
109. Zhou, H., et al., *Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(5): p. 495-504.
110. König, R., et al., *Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication*. Cell, 2008. **135**(1): p. 49-60.
111. Krishnan, M.N., et al., *RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection*. Nature, 2008. **455**(7210): p. 242-5.
112. Karlas, A., et al., *Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 818-822.
113. Tai, A.W., et al., *A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication*. Cell host & microbe, 2009. **5**(3): p. 298-307.
114. Zenner, H.L., et al., *Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment*. J Virol, 2011. **85**(16): p. 8012-21.
115. Wang, X., C. Patenode, and B. Roizman, *US3 protein kinase of HSV-1 cycles between the cytoplasm and nucleus and interacts with programmed cell death*

- protein 4 (PDCD4) to block apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(35): p. 14632-14636.
116. Durand, L.O. and B. Roizman, *Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10591-9.
  117. Escudero-Paunetto, L., et al., *SR proteins SRp20 and 9G8 contribute to efficient export of herpes simplex virus 1 mRNAs*. Virology, 2010. **401**(2): p. 155-164.
  118. Sarma, N., et al., *Small interfering RNAs that deplete the cellular translation factor eIF4H impede mRNA degradation by the virion host shutoff protein of herpes simplex virus*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6600-9.
  119. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and Stowaways: Incorporation of Cellular Proteins by Enveloped Viruses*. Journal of Virology, 2005. **79**(11): p. 6577-6587.
  120. Ott, D.E., *Cellular proteins detected in HIV-1*. Reviews in Medical Virology, 2008. **18**(3): p. 159-175.
  121. Krauss, O., et al., *An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles*. J Gen Virol, 2002. **83**(10): p. 2347-2359.
  122. Shaw, M.L., et al., *Cellular Proteins in Influenza Virus Particles*. PLoS Pathog, 2008. **4**(6): p. e1000085.
  123. Moerdyk-Schauwecker, M., S.-I. Hwang, and V.Z. Grdzlishvili, *Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach*. Virology Journal, 2009. **6**(1): p. 166.
  124. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
  125. Kattenhorn, L.M., et al., *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11187-97.
  126. Kramer, T., et al., *Proteomic Characterization of Pseudorabies Virus Extracellular Virions*. J. Virol., 2011. **85**(13): p. 6427-6441.
  127. Johannsen, E., et al., *Proteins of purified Epstein-Barr virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(46): p. 16286-91.
  128. Bechtel, J.T., R.C. Winant, and D. Ganem, *Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4952-64.
  129. Dry, I., et al., *Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5390-7.
  130. Okamoto, Y. and S. Shikano, *Phosphorylation-dependent C-terminal Binding of 14-3-3 Proteins Promotes Cell Surface Expression of HIV Co-receptor GPR15*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(9): p. 7171-7181.
  131. Kino, T., et al., *Vpr Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Binds to 14-3-3 Proteins and Facilitates Complex Formation with Cdc25C: Implications for Cell Cycle Arrest*. Journal of Virology, 2005. **79**(5): p. 2780-2787.
  132. Muñoz-Fontela, C., et al., *Latent Protein LANA2 from Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with 14-3-3 Proteins and Inhibits FOXO3a Transcription Factor*. Journal of Virology, 2007. **81**(3): p. 1511-1516.
  133. Hsu, N.-Y., et al., *Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication*. Cell, 2010. **141**(5): p. 799-811.
  134. Yedavalli, V.S.R.K., et al., *Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function*. Cell, 2004. **119**(3): p. 381-392.

135. Owsianka, A.M. and A.H. Patel, *Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3*. Virology, 1999. **257**(2): p. 330-40.
136. Feng, P., D.N. Everly, and G.S. Read, *mRNA Decay during Herpes Simplex Virus (HSV) Infections: Protein-Protein Interactions Involving the HSV Virion Host Shutoff Protein and Translation Factors eIF4H and eIF4A*. Journal of Virology, 2005. **79**(15): p. 9651-9664.
137. Sainis I. , A.C., Pagoulatos G. N. , and Lazaridis I., *HSC70 interactions with SV40 viral proteins differ between permissive and nonpermissive mammalian cells*. Cell Stress Chaperones, 2000 April. **5**(2): p. 132–138.
138. Burch, A.D. and S.K. Weller, *Nuclear Sequestration of Cellular Chaperone and Proteasomal Machinery during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection*. Journal of Virology, 2004. **78**(13): p. 7175-7185.
139. Fang, D., et al., *Heat Shock Cognate Protein 70 Is a Cell Fusion-Enhancing Factor but Not an Entry Factor for Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **261**(2): p. 357-363.
140. Barcelos, A.C.N. and M.N. Sotto, *Comparative analysis of the expression of cytokeratins (1, 10, 14, 16, 4), involucrin, filaggrin and e-cadherin in plane warts and epidermodysplasia verruciformis plane wart-type lesions*. Journal of Cutaneous Pathology, 2009. **36**(6): p. 647-654.
141. Chuang, Y.-C., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability*. Cytokine, 2011. **54**(2): p. 222-231.
142. Bacher, M., et al., *Human Cytomegalovirus-Mediated Induction of MIF in Fibroblasts*. Virology, 2002. **299**(1): p. 32-37.
143. Regis, E.G., et al., *Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: A relevant role on viral replication*. Virology, 2010. **399**(1): p. 31-38.
144. Amet, T., et al., *CD59 incorporation protects hepatitis C virus against complement-mediated destruction*. Hepatology, 2012. **55**(2): p. 354-363.
145. Shan, C., et al., *Hepatitis B virus X protein activates CD59 involving DNA binding and let-7i in protection of hepatoma and hepatic cells from complement attack*. Carcinogenesis, 2011. **32**(8): p. 1190-1197.
146. Lotti, L.V., et al., *Immunocytochemical analysis of the transfer of vesicular stomatitis virus G glycoprotein from the intermediate compartment to the Golgi complex*. The Journal of Cell Biology, 1992. **118**(1): p. 43-50.
147. Krijnse-Locker, J., et al., *Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step*. The Journal of Cell Biology, 1994. **124**(1): p. 55-70.
148. Berger, K.L., et al., *Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(18): p. 7577-7582.
149. Lozach, P.-Y., et al., *Entry of Bunyaviruses into Mammalian Cells*. Cell Host & Microbe, 2010. **7**(6): p. 488-499.
150. Su, W.-C., et al., *Rab5 and Class III Phosphoinositide 3-Kinase Vps34 Are Involved in Hepatitis C Virus NS4B-Induced Autophagy*. Journal of Virology, 2011. **85**(20): p. 10561-10571.

151. van der Schaar, H.M., et al., *Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells*. PLoS Pathog, 2008. **4**(12): p. e1000244.
152. Krishnan, M.N., et al., *Rab 5 Is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses*. Journal of Virology, 2007. **81**(9): p. 4881-4885.
153. Clemente, R. and J.C. de la Torre, *Cell Entry of Borna Disease Virus Follows a Clathrin-Mediated Endocytosis Pathway That Requires Rab5 and Microtubules*. Journal of Virology, 2009. **83**(20): p. 10406-10416.
154. Indran, S.V. and W.J. Britt, *A Role for the Small GTPase Rab6 in Assembly of Human Cytomegalovirus*. Journal of Virology, 2011. **85**(10): p. 5213-5219.
155. Chung, C.-S., et al., *Vaccinia Virus Proteome: Identification of Proteins in Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion Particles*. Journal of Virology, 2006. **80**(5): p. 2127-2140.
156. Momose, F., et al., *Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome*. PLoS ONE, 2011. **6**(6): p. e21123.
157. Eisfeld, A.J., et al., *RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane*. Journal of Virology, 2011. **85**(13): p. 6117-6126.
158. Desai, P. and S. Person, *Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7563-8.
159. Angus, A.G., et al., *Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 1): p. 122-32.
160. Loret, S. and R. Lippe, *Biochemical Analysis of ICP0, ICP4, UL7 and UL23 Incorporated into Extracellular Herpes Simplex Type 1 Virions*. J Gen Virol, 2011: p. In press.
161. Zhang, Y.Q., et al., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA*. Clin Exp Dermatol, 2008. **33**(1): p. 56-61.
162. Weinheimer, S.P., et al., *Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 258-69.
163. Indran, S.V. and W.J. Britt, *A Role for the Small GTPase Rab6 in Assembly of Human Cytomegalovirus*. J. Virol., 2011. **85**(10): p. 5213-5219.
164. Eisfeld, A.J., et al., *RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane*. J. Virol., 2011. **85**(13): p. 6117-6126.
165. Spear, G., et al., *Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV)*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(9): p. 4376-4381.
166. Zhu, F.X., et al., *Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 800-11.
167. Page, H.G. and G.S. Read, *The Virion Host Shutoff Endonuclease (UL41) of Herpes Simplex Virus Interacts with the Cellular Cap-Binding Complex eIF4F*. J. Virol., 2010. **84**(13): p. 6886-6890.
168. Chung, S.-K., et al., *Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells*. Virology, 2005. **333**(1): p. 31-40.
169. Guerrero, C.A., et al., *Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry*. Journal of Virology, 2002. **76**(8): p. 4096-4102.

170. Gorziglia, M., et al., *Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2978-84.

# **Annexe 1**

**Article en rédaction:**

**Identification par criblage aux ARN d'interférence des protéines de  
l'hôte incorporées requises pour une infection par le virus d'Herpès de  
type 1**

par

**Camille Stegen, Yordanka Yakova, Daniel Henaff, Julien Nadjar, Johanne Duron et  
Roger Lippé\***

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7





**Identification of Virion-Incorporated Host Proteins Required for Herpes Simplex  
Virus Type 1 Infection through a RNA Interference Screen**

by

**Camille Stegen, Yordanka Yakova, Daniel Henaff, Julien Nadjar, Johanne Duron and  
Roger Lippe<sup>\*</sup>**

Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal,  
Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Running title : Novel HSV-1 Host Protein Interactions

Word count for the abstract: 248

Word count for the text: 8616



## ABSTRACT

Viruses are strictly dependent on cells to propagate and many incorporate host proteins in their viral particles, but the significance of this incorporation is poorly understood. Recently, we performed the first comprehensive characterization of the mature herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in which up to 49 distinct cellular proteins were identified by mass spectrometry. In the present study, we sought to identify which of these cellular factors are relevant for the HSV-1 life cycle. To this end, we performed a small interfering RNA functional screen and found that 15 of the host proteins altered HSV-1 proliferation in cell culture. These include several Rab GTPases and other intracellular transport components as well as proteins involved in signal transduction, gene regulation and immunity. This modulation was specific for HSV-1 as only one of the proteins also impacted Adenovirus type 5 propagation. Remarkably, both the cellular and virion-associated pools of many of these proteins actively contributed to viral propagation, highlighting for the first time the important contribution of host proteins within mature viral particles. Among them is the DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked protein (DDX3X), a multifunctional molecule previously linked to several other viruses. Its relevance for HSV-1 was orthogonally confirmed with a DDX3X thermosensitive cell line. Closer examination revealed that inactivation of DDX3X reduced the abundance of intracellular capsids as well as the initial expression of immediate-early genes. Altogether, these findings underscore the power and biological relevance of combining proteomics and RNA interference to identify novel host-pathogen interactions.

## AUTHOR SUMMARY

Viruses are obligatory parasites that exploit the cellular machinery and can specifically incorporate host proteins, but the significance of this incorporation is unclear. To address this issue, we explored by RNA interference the implication of the 49 cellular proteins we previously identified in mature herpes simplex virus type 1 virions. Fifteen of these proteins proved to be important for the efficient propagation of the virus including several Rab GTPases and other intracellular transport components as well as proteins involved in signal transduction, gene regulation and immunity. This was largely specific for HSV-1, as all but one didn't have any measurable effect on Adenovirus type 5, another DNA virus. Remarkably, both the cellular and virion-associated fractions of many of the positive proteins actively contributed to viral propagation, thus underlining the close relationship between the virus and its host. Further analysis of one of these proteins, the multifunctional DDX3X RNA helicase, orthogonally confirmed its relevance for the virus and revealed that its inactivation reduced intracellular capsid abundance possibly via a delay of immediate-early gene expression. Hence our data hint at a potential role of DDX3X early in the infection and confirm the relevance of combining proteomic with RNA interference to identify new host-pathogen interactions.

## INTRODUCTION

The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is composed of a DNA core within an icosahedral capsid surrounded by a heterogeneous and poorly characterized layer of proteins called tegument, which is itself wrapped in an envelope. Interestingly, several components of the tegument are critical at an early stage of the infection. For example, the binding of incoming viral capsids to microtubules and their transport to the nucleus are dependent on components of the tegument, including the viral proteins UL36 and UL37 [1,2,3,4]. Furthermore, the incoming virion host shut off protein (Vhs; UL41) quickly downregulates the expression of several host proteins following viral entry [5,6] while ICP0, ICP4 and VP16, also tegument proteins, regulate the cascade of viral gene expression [7,8,9,10,11,12].

The importance and complexity of the HSV-1 tegument is illustrated by a recent mass spectrometry study of highly purified extracellular virions, which revealed 23 potential viral teguments and up to 49 distinct cellular proteins [13]. This analysis showed that roughly half of the host proteins found in HSV-1 virions are proteins that had not yet been reported in herpesviruses. In contrast, the presence of members of the annexin and heat shock protein families as well as cyclophilin A, DDX3X and components of the cytoskeleton have been documented in other *Herpesviridae* [13,14,15,16,17], suggesting a common function for these proteins.

Although the presence of cellular proteins in mature virions is not surprising since some have been found incorporated into the human immunodeficiency virus (HIV [18,19,20]), influenza [21], vesicular stomatitis virus [22], vaccinia [23], human cytomegalovirus (HCMV [15,16,24]), Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV [25]), pseudorabies virus (PRV [17,26]), Epstein-Bar virus (EBV [27]), alcelaphine herpesvirus 1 [28] and the murine cytomegalovirus (MCMV [29]), their biological relevance is, at best, unclear. The incorporation of host proteins within the mature viral particles presumably benefits the virus and may for example jump-start its replication cycle. In contrast, viruses also avoid the incorporation of proteins that can inhibit their replication. One such case is the HIV protein Vif that binds to the host APOBEC3G protein to prevent its inclusion into nascent virions and prevent deamination of the viral genome by this RNA editing protein [18]. It is thus likely that the incorporation of host proteins in

viruses is not random but rather a regulated process. Unfortunately, only a few studies have examined the relevance of this phenomenon in the course of an infection [20,23,30,31,32].

In the present study, we aimed to identify amidst the 49 host proteins found in HSV-1 mature particles those that influence its replication and proliferation. To this end, we designed and validated a functional screening assay using small interfering RNAs (siRNA) and a fluorescent-tagged virus as a probe. We now report that 15 of these proteins have a significant impact on HSV-1 propagation in cell culture, with limited siRNA-associated toxicity or effect on the propagation of another double-stranded DNA virus, the human Adenovirus type 5. Positive hits include proteins involved in vesicular transport, gene regulation, signaling and immunity. Furthermore, we show functional evidence that the presence of many of these proteins in mature virions is important for HSV-1 infectivity. We also analyzed in deeper details the DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked protein (DDX3X), a protein that has previously been shown to impact the proliferation of HIV [33,34,35], vaccinia [36,37], hepatitis C (HCV [38,39]) and hepatitis B (HBV [40]) viruses. The implication of DDX3X for HSV-1 proliferation was orthogonally confirmed with a temperature-sensitive DDX3X cell line. Finally, plaque assays, fluorescence microscopy and Western blotting revealed that the lack of functional DDX3X strongly reduced the amount of intracellular virions and temporally altered the expression of the immediate-early ICP0 and ICP4 genes confirming the efficacy of our combined proteomic and RNAi approach to decipher host-pathogen relationships.

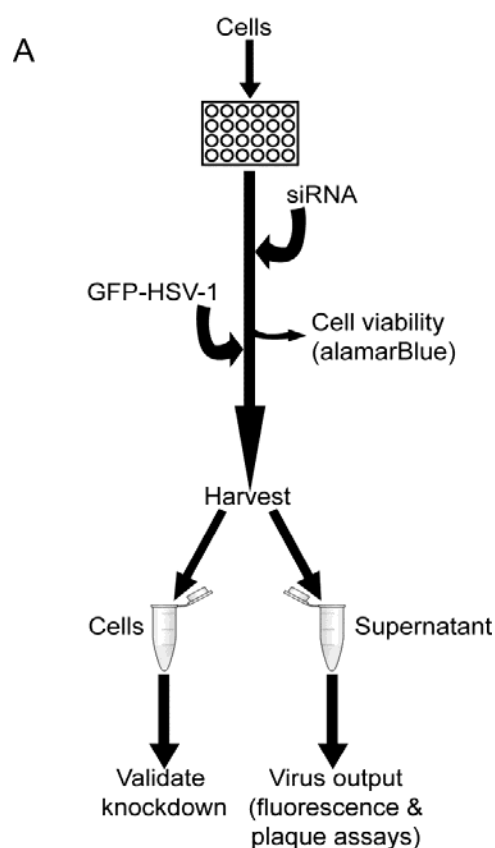
## RESULTS

### Validation of the siRNA-based assay

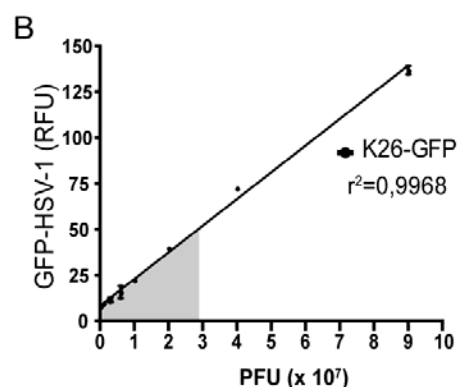
Our strategy to examine the physiological relevance of the host proteins identified in mature HSV-1 virions involved a novel viral propagation assay based on RNA interference and HSV-1 K26GFP, a wild-type virus in which the *Aequorea victoria* green fluorescent protein (GFP) is fused to the capsid protein VP26 [41] (Figure 1A). This approach enabled us to easily, rapidly and quantitatively screen many targets without resorting to the classical but time-consuming and cumbersome plaque assays to measure viral output. We selected a human cell line because it is the HSV-1 natural reservoir, is compatible with our previous proteomics report [13] and the human siRNA library commercially available. We opted for the human osteosarcoma-derived 143B cell line since it is more resistant to the cytopathic effects of the virus and produces significantly greater quantities of extracellular viruses upon infection than the HeLa cells originally used in our proteomic study ([42,43] and data not shown). In addition, 143B cells have a greater than 80% siRNA transfection rate, an important criterion for this study (data not shown). Cell plating density, infection conditions, harvesting time, assay buffers, plate format and parameters of the plate reader software were all extensively optimized (data not shown) to ensure that the fluorescence read-out in the supernatant was accurate, linear and sufficiently sensitive to detect extracellular virions (Figure 1B).

We next sought to validate that the assay could indeed detect the impact of known inhibitors of the HSV-1 life cycle. We therefore pretreated cells with MG132, an inhibitor of the proteasome that perturbs the post-entry delivery of HSV-1 to the nucleus [44], phosphonoacetic acid (PAA) which prevents viral replication [45] and brefeldin A (BFA) which arrests viral egress of newly synthesized viral particles [46,47]. As expected, HSV-1 output was drastically lower in drug-treated cells than in untreated ones (Figure 2A). As a second control, cells were transfected with siRNA targeting a HSV-1 protein. The viral protein VP16 (UL48) was chosen because its inhibition by siRNA is known to efficiently reduce VP16 expression and viral production [11]. Cells were thus transfected for 48 hours prior to infection with the single most effective siRNA targeting VP16 [11], a scrambled sequence of the VP16 siRNA as negative control (scVP16) or with Lipofectamine only. The knockdown of VP16 was evaluated in parallel by Western blotting and quantified with

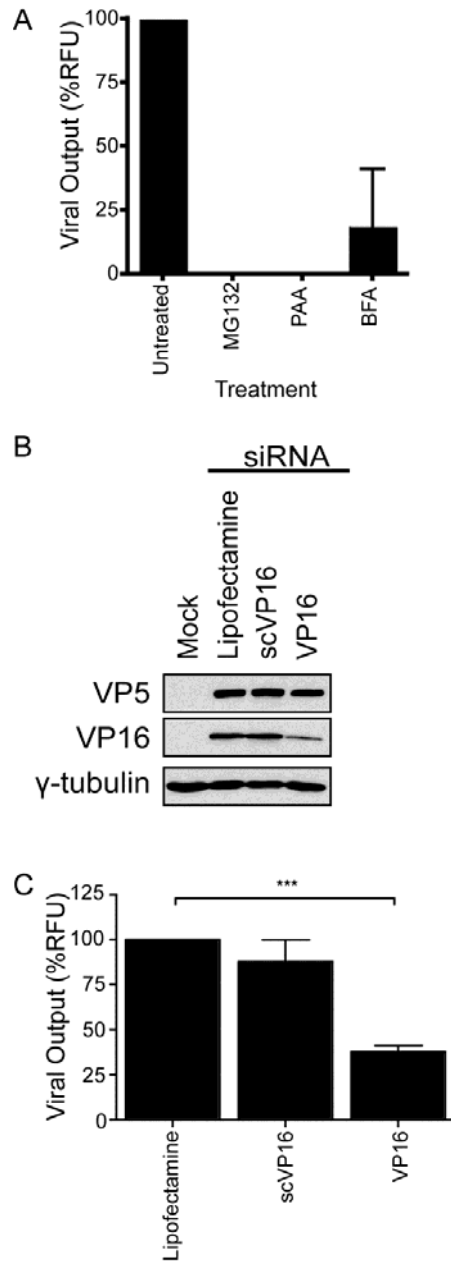
ImageJ, which revealed the high efficacy of the siRNA employed (up to 88% inhibition; Figure 2B). Though the inhibition of VP16 was not absolute, the extracellular viral yields were significantly lower upon treatment with siRNA against VP16 than for cells treated with the transfection agent only or the scrambled control (Figure 2C). Taken together these results demonstrate the sensibility and specificity of the assay.



**Figure 1. Screening method.** *A) 143B cells were seeded in 24-well plates 24 hours prior to transfection. Cells were then transfected with siRNA and incubated 48 hours before being infected with HSV-1 K26GFP for an additional 24 hours. Supernatants were collected and their fluorescence was measured using a spectrofluorometer. As a cytotoxicity control, cell viability was assessed in parallel using alamarBlue. In addition, the cells were lysed and used for Westerns to validate the siRNA knockdowns. B) The fluorescence of pre-titered infectious HSV-1 K26GFP particles serially diluted in PBS was quantified using a Gemini EM spectrofluorometer. The fluorescence obtained was linear with the titers through the entire selection ( $r^2=0.9968$ ), thus demonstrating the advanced sensitivity of the device. The gray area denotes the typical range of the assay. RFU: relative fluorescence units.*







**Figure 2. Validation of the assay.** 143B cells were seeded in 24-well plates and infected with HSV-1 K26GFP and A) treated with drugs targeting HSV-1 post-entry (MG132), replication (PAA) and egress (BFA). B-C) As above except that cells were instead transfected for 48 hours prior to infection with Lipofectamine only, a scrambled version of the VP16 siRNA or siRNA targeting VP16. For panel A and C, the fluorescent viruses in the supernatants were concentrated by centrifugation at 24 hpi and quantified using a spectrofluorometer. For panel B, 25 µg of proteins from cell lysates were tested by Western blotting for VP16 knockdown. □-Tubulin was used as loading control. The error bars show the standard deviations to the mean of three independent experiments. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the siRNA free control (\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

### Assessment of host proteins critical for the viral infection

To evaluate the functional relevance of the cellular proteins identified in mature extracellular virions, we examined them using the above siRNA screen. Since some of the peptides that were identified in the course of the proteomic study are common to different protein isoforms, we also screened them, thus lengthening our original list of proteins to 58 (Table 1). The siRNA targeting VP16 and its scrambled version (scVP16) were once again used as controls. For each of the human targets identified in our proteomic study [13], we

used a pool of four different siRNA duplexes to ensure the most effective knockdowns and to reduce off-target effects. These siRNA pools are commercially available and predefined by the manufacturer according to their proprietary algorithm (see Table 1 for catalogue numbers). Cells were transfected in triplicates with these siRNA for 48 hours, to allow endogenous levels of the host proteins to significantly decrease, and subsequently infected with GFP tagged HSV-1. Twenty-four hours later, the virus-associated fluorescence was measured with a plate reader. Though both the intracellular and extracellular viral pools could be quantified, we opted to only probe the latter since free VP26-GFP is inevitably present in infected cells and would contribute to a higher background. Each experiment was normalized to the mean fluorescence obtained in supernatants from cells transfected with the transfection agent only and results from three independent screens were compiled. This method allowed us to identify several cellular proteins whose absence significantly altered viral production. Interestingly, in all but one case (ANXA1) these reproducibly reduced viral output (Figure 3, bars).

**Table 1: Proteins tested in the siRNA screen**

Protein Name	Gene ID	Symbol	Catalog Number
14-3-3 protein epsilon	7531	YWHAE	M-017302-02
14-3-3 protein gamma	7532	YWHAG	M-008844-00
14-3-3 protein zeta/delta	7534	YWHAZ	M-003332-01
Alpha actin	58	ACTA1	M-011194-00
Beta actin	60	ACTB	M-003451-03
Gamma actin	71	ACTG1	M-005265-01
Annexin A1	301	ANXA1	M-011161-01
Annexin A2	302	ANXA2	M-010741-02
Annexin A5	308	ANXA5	M-011209-01
Arf1	375	ARF1	M-011580-01
Arf3	377	ARF3	M-011581-00
Arf4	378	ARF4	M-011582-01
Arf5	381	ARF5	M-011584-01
ATP dependant RNA helicase DDX3X	1654	DDX3X	M-006874-01
Casein kinase 2	1457	CSNK2A1	M-003475-03
Cofilin 1	1072	CFL1	M-012707-00
Cyclophilin A	5478	PPIA	M-004979-01
Cystein-glycin rich protein 1	1465	CSRP1	M-011839-02

Eukaryotic translation initiation factor 4H	7458	EIF4H	M-013054-00
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	GAPDH	M-004253-02
Growth factor receptor bound protein 2	2885	GRB2	M-019220-00
Heat Shock 70 protein 8 <sup>a</sup>	3312	HSPA8	M-017609-01
Keratin 1	3848	KRT1	M-012865-02
Keratin 10	3858	KRT10	M-023057-00
Macrophage Migration Inhibitory Factor	4282	MIF	M-011335-01
CD59 <sup>b</sup>	966	CD59	M-004537-01
NM23A <sup>c</sup>	4830	NME1	M-006821-01
NM23B <sup>c</sup>	4831	NME2	M-005102-02
Peroxiredoxin-1	5052	PRDX1	M-010338-00
Peroxiredoxin-2	7001	PRDX2	M-008178-03
Profilin-1	5216	PFN1	M-012003-01
Programmed cell death protein 6	10016	PDCD6	M-004440-03
Rab2a	5862	RAB2A	M-010533-01
Rab2b	84932	RAB2B	M-010370-00
Rab4b	53916	RAB4B	M-008780-03
Rab5a	5868	RAB5A	M-004009-00
Rab5b	5869	RAB5B	M-004010-01
Rab5c	5878	RAB5C	M-004011-01
Rab6a	5870	RAB6A	M-008975-01
Rab6b	51560	RAB6B	M-008548-02
Rab6c	84084	RAB6C	M-009031-02
Rab7A	7879	RAB7	M-010388-00
Rab10	10890	RAB10	M-010823-01
Rab11a	8766	RAB11A	M-004726-02
Rab11b	9230	RAB11B	M-004727-02
Rab15	376267	RAB15	M-031564-00
Rab33B	83452	RAB33B	M-008909-02
Rab35	11021	RAB35	M-009781-00
Rab-like protein 3	285282	RABL3	M-018128-01
S100 calcium protein binding A11	6282	S100A11	M-012138-00
SEC14-like 4	284904	SEC14L4	M-019246-00
Tetraspanin 13	27075	TSPAN13	M-012516-01
Transferrin Receptor (CD71)	7037	TFRC	M-003941-02
Transgelin 2	8407	TAGLN2	M-011468-02
Translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog	92609	TIMM50	M-023692-01
Triosephosphatase isomerase	7167	TPI1	M-009776-02

Ubiquitin C	7316	UBC	M-019408-01
Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	7332	UBE2L3	M-010384-01

<sup>a</sup>*HSP70 (Loret, 2008)*

<sup>b</sup>*Membrane attack complex inhibition factor (Loret, 2008)*

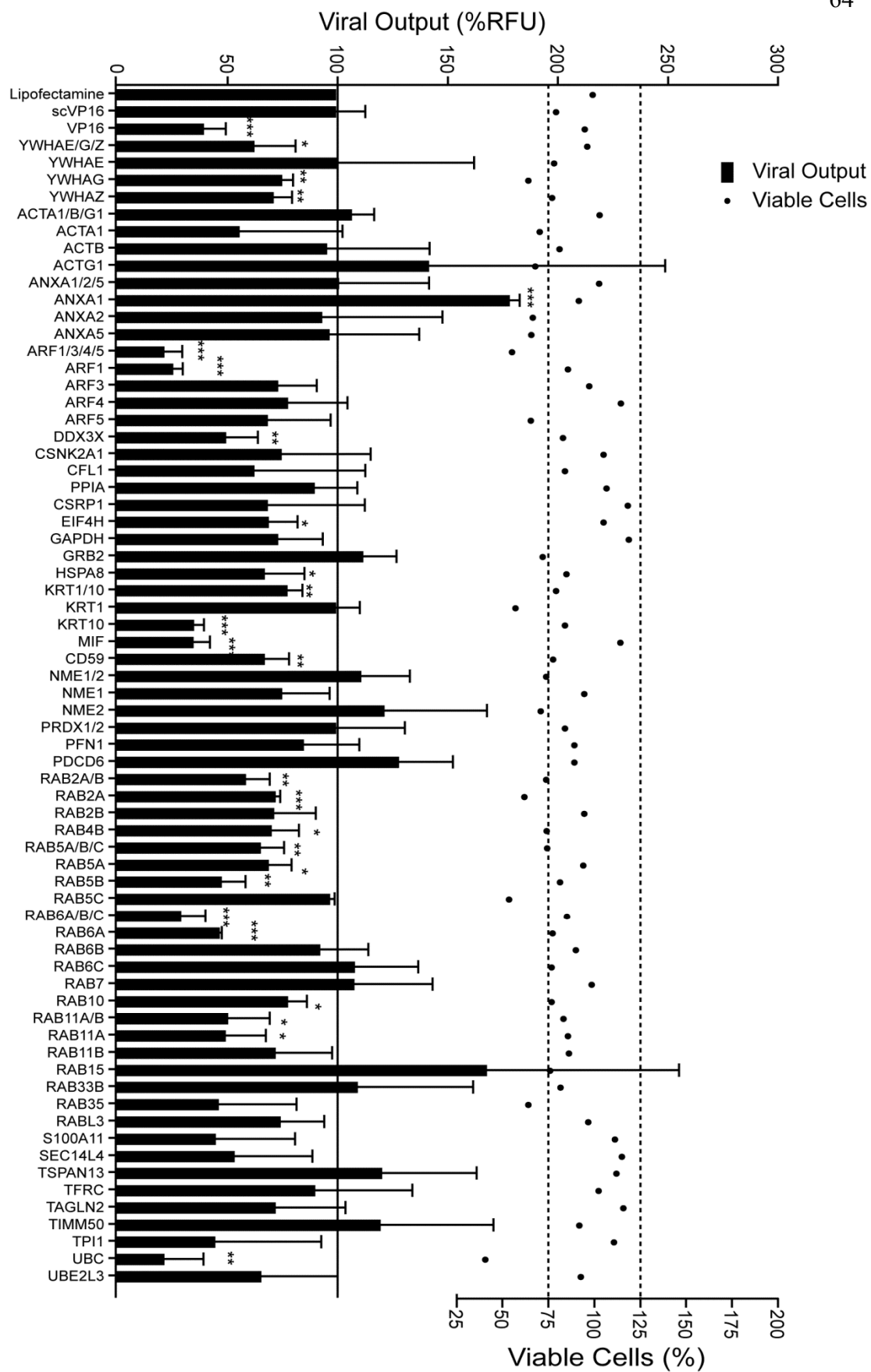
<sup>c</sup>*Nucleoside diphosphate kinase A/B (Loret, 2008)*

To evaluate the toxicity of the siRNA reagents and rule out nonspecific effects, the viability of the cells was monitored in parallel using the redox indicator alamarBlue that quantitatively monitors cell metabolism and, consequently, overall cell viability (Figure 3, dots). Of the proteins that altered viral output, only the inhibition of ubiquitin C resulted in high cytotoxicity under our experimental conditions and the results obtained for that protein were thus considered nonspecific. It is relevant to note that targeting some of the proteins resulted in lower cellular viability without any impact on viral production (e.g. KRT1 and RAB5C), further highlighting the genuine implication of the other cellular proteins on the HSV-1 viral life cycle.

Given that the GFP-based assay used in this study detects total viral particles rather than infectious virions, the positive hits were confirmed by conventional plaque assays to measure viral titers following siRNA treatment. 143B cells were transfected with siRNA, infected as before and the infectious particles in the supernatant were titrated on Vero cells. As expected, infected cells treated with the Lipofectamine or scrambled control produced normal levels of extracellular infectious particles. Moreover, nearly all siRNA against the host proteins tested caused a significant reduction in viral yields and were thus fully coherent with the GFP detection assay (Figure 4). One exception was annexin A1 whose titers were not significantly different than those of infected cells treated with the negative controls. Similarly, the inhibition of Rab4B reduced the viral yields by less than 25%, a diminution that is unlikely to be of any biological significance. Both proteins were therefore excluded from the positive results. Taken together, these data largely validated the GFP based readouts.

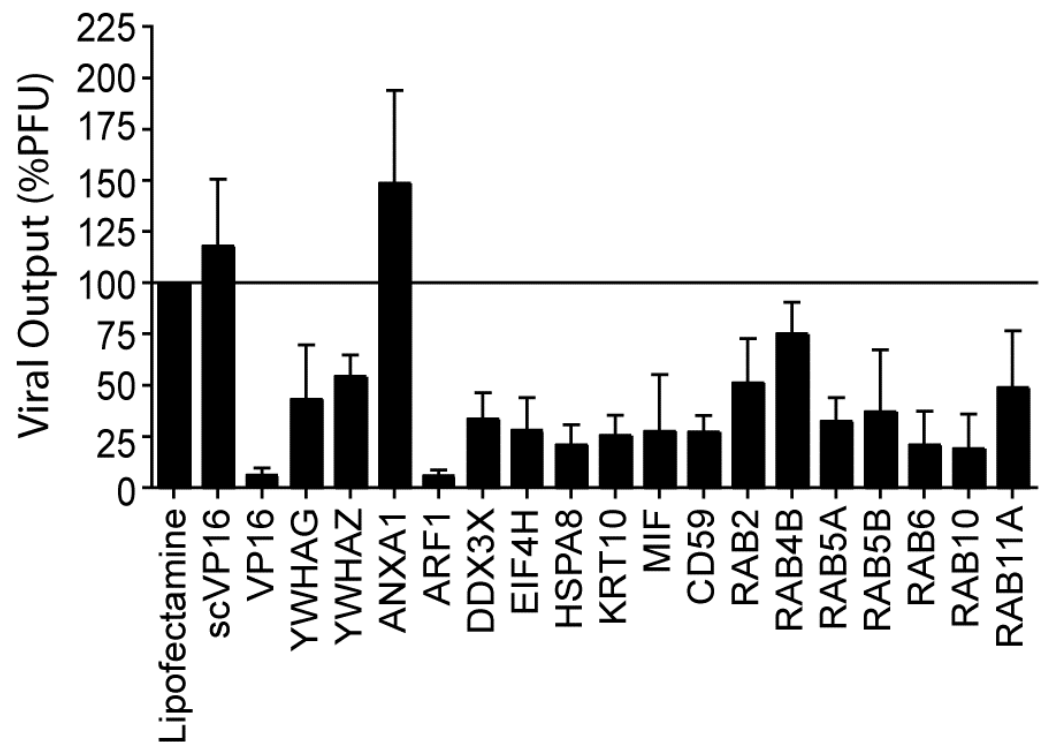
Thus far, our data support the involvement in the HSV-1 life cycle of at least 15 of the host proteins found incorporated within mature virions. To evaluate the specificity of these cellular proteins in HSV-1 propagation, 143B cells were transfected with siRNAs targeting the positive hits and infected with human Adenovirus type 5, another double-stranded DNA virus replicating in the nucleus. In this experiment, the siRNA targeting the

HSV-1 protein VP16 served as negative control whereas a siRNA targeting the hexon protein [48] was used as positive control. As expected, siRNA targeting the adenoviral hexon reduced viral yields (68% inhibition) while siRNA targeting VP16 did not (118%). Interestingly, only one of the 15 proteins (i.e. Arf1) tested negatively influenced Adenovirus proliferation (60% inhibition; data not shown). This indicated that the host proteins found in HSV-1 specifically modulated HSV-1 proliferation and ruled out general cellular defects.



### Figure 3. siRNA screen against the host proteins identified in mature

**extracellular virions.** 143B cells were transfected for 48 hours with Lipofectamine alone or with siRNA duplexes targeting the indicated cellular proteins (gene names are indicated on the left). Forty-eight hours later, cellular viability was assessed by alamarBlue or cells were infected in parallel with K26GFP at a MOI of 5 for a further 24 hours. The fluorescence in the supernatant was quantified using a Gemini EM spectrofluorometer. The data was normalized to the mean value obtained with Lipofectamine only samples. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the Lipofectamine only control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ ). The solid line represents the relative fluorescence intensity of the Lipofectamine treated samples while the dotted lines indicate + 25% viability. The error bars show the standard deviations to the means of three independent experiments, each done in triplicates.



**Figure 4. Impact of siRNA transfection by conventional plaque assays.** 143B cells were transfected with siRNA and infected with K26GFP as before for the samples that were positive hits in Figure 3. Supernatants were individually collected and their viral content titrated on Vero cells. The titers were normalized to the mean value obtained with samples treated with Lipofectamine only. The error bars show the standard deviations to the means of three independent experiments. PFU: Plaque forming units.

### **Importance of the proteins present in the mature virions**

Several viruses have been reported to incorporate cellular proteins but the significance of this incorporation is often unclear. There are various reasons why cellular proteins could be incorporated in virions. Some of them may simply be incorporated in virions because they are abundant and/or happen to be at the right place and time but are not valuable to the virus. A second possibility is they may be included as a consequence of their implication during viral assembly, intracellular transport or egress. In such cases, the proteins would not necessarily be important to initiate the next round of infection. Finally, other proteins may specifically be required to promote the infection of neighboring cells. In this exciting scenario, the depletion of these cellular proteins from the viral particles should stop or delay the next replication cycle, much the same way VP16 deletion mutants do not grow well on a non-complementary cells [49]. We thus wished to directly address the functional significance of the virion-associated host proteins. Since these proteins are present in mature virions but also in the cell, the respective contribution of both of these pools to the viral life cycle was assessed. To this end, a two-step approach was employed. First, viruses depleted for each of the 15 positive targets identified above were produced on siRNA-treated cells. As controls, viruses were also harvested from Lipofectamine-treated cells and from cells treated with VP16 or scVP16 siRNAs. The efficacy of the siRNA to produce protein-depleted extracellular virions was then examined by Western blotting for three of the proteins, which proved to be robust (Figure 5). Since all conditions do produce some virus despite the siRNA-induced inhibition (see Figures 3-4), each stock of virus were titrated and used to re-infect a fresh monolayer of cells at an equal multiplicity of infection (MOI). In this second step, to distinguish the virion-incorporated host proteins from the ones found in the cells, control or siRNA-treated cells were infected with viruses harvested from cells treated only with Lipofectamine (i.e. equivalent to wild type virus) or viruses depleted of the individual host proteins. Since the siRNA did not completely prevent the incorporation of the targeted protein (Figure 5), cells were infected at MOI of 0.1 to reduce the risk of complementation between depleted and normal virions. As expected, the infection of VP16 siRNA-treated cells with virus produced on Lipofectamine-treated cells strongly reduced viral yields, confirming that newly expressed VP16 regulates the viral life cycle (Table 2) Though not as extensive, the infection of normal cells (i.e. Lipofectamine-treated) with VP16-depleted virions also significantly reduced viral



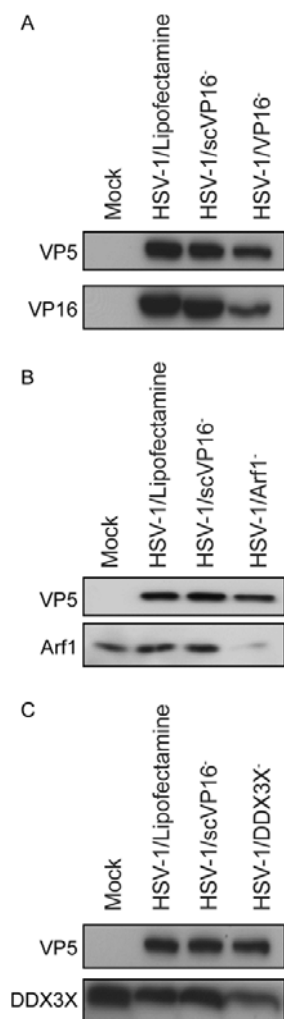
production, consistent with past reports that the virion associated pool of VP16 is actively involved in the early stages of the infection process [49]. As expected, the depletion of both newly expressed and virion-associated VP16 (i.e. infection of VP16 siRNA-treated cells with VP16-depleted virions) further reduced viral output compared to the virion-only depleted sample, hence reiterating the importance of both newly expressed and virion-associated VP16 pools during the HSV-1 infection. We next applied this strategy to the 15 host proteins found in the virions that were positive in the siRNA screen. The depletion from the mature virions of 8 of them (DDX3X, MIF, RAB5A, HSPA8, KRT10, RAB6A, RAB10 and YWHAZ) reduced viral production by at least 50% in normal cells, with evidence of a minor participation of other targets (Table 2). Given this occurred in the presence of a normal complement of host proteins, this reemphasized the specific implication of these proteins on HSV-1 replication (Figures 3 and 4) rather than an indirect effect due to unhealthy cells. Most important, this indicated for the first time that both the cellular and the virion-incorporated pools of these proteins do indeed participate in the HSV-1 replication cycle.

**Table 2: Implication of the virion-incorporated cellular proteins in HSV-1 replication.**

*Cells were treated with Lipofectamine and infected for 24 hours with wild type virus (+/+) or with viruses depleted of the protein indicated to the left. (+/-). Alternatively, cells were pretreated with siRNA and infected with wild type virus (-/+) or protein-depleted virions (-/-). Infections were performed at an equal MOI and extracellular virions were measured by standard plaque assays. Titers were normalized to the mean value of Lipofectamine-treated cells infected with wild type virus. The values indicate the means of three independent experiments. Values in parenthesis are the standard deviations.*

		Viral Output in % PFU (SD)			
Presence in cell :		+	+	-	-
Presence in virus :		+	-	+	-
<b>Controls</b>					
Lipofectamine	100				
scVP16		137 (41)	223 (38)	198 (48)	
VP16		37 (24)	6 (5)	10 (9)	
<b>Host Proteins</b>					
DDX3X		24 (0,1)	40 (24)	17 (13)	
MIF		27 (9)	15 (0,1)	18 (7)	
RAB5A		33 (10)	42 (24)	32 (7)	

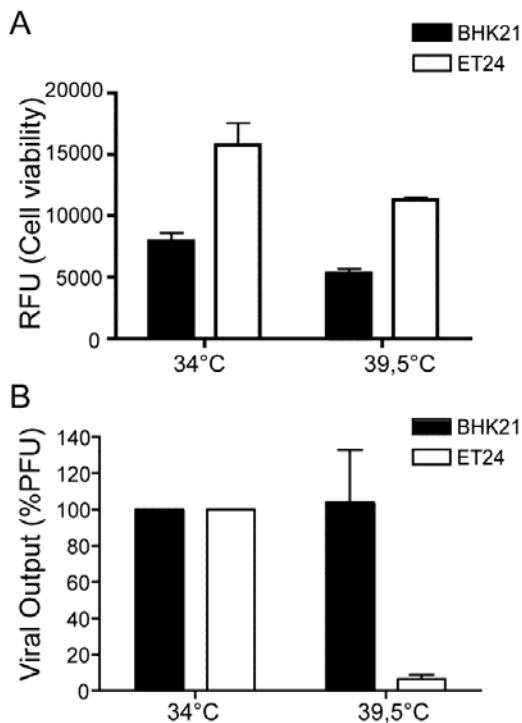
HSPA8	40 (11)	22 (9)	26 (22)
KRT10	45 (20)	66 (4)	63 (31)
RAB6A	45 (26)	44 (18)	26 (13)
RAB10	47 (12)	31 (19)	28 (19)
YWHAZ	49 (3)	74 (9)	59 (9)
RAB5B	52 (30)	66 (11)	47 (14)
RAB2A	55 (6)	73 (8)	62 (16)
CD59	58 (12)	49 (14)	33 (22)
YWHAG	58 (13)	73 (9)	53 (9)
ARF1	63 (8)	21 (2)	14 (10)
eIF4H	68 (8)	50 (10)	33 (9)
RAB11A	74 (38)	58 (18)	43 (24)



**Figure 5. Virions harvested from siRNA treated cells are depleted of the siRNA-targeted protein.** *143B* cells were transfected with Lipofectamine only or siRNAs against the control VP16 or the positive hits *Arf1* and *DDX3X*. They were then infected at a MOI of 5 with HSV-1 K26GFP and the supernatants collected at 24 hours. Concentrated supernatants corresponding to equal amounts of VP5 were analyzed and 20  $\mu$ g of Lipofectamine-treated cell lysate was used as control. The reduced levels of A) VP16, B) *ARF1* and C) *DDX3X* in newly produced virions in the supernatants were confirmed by Western blotting.

**DDX3X: A novel player in the HSV-1 replication cycle**

To confirm the relevance of the cellular proteins identified in this study for HSV-1 proliferation, we further studied the effect of one of these targets, DDX3X. This protein is multifunctional and well conserved from yeast to human [50]. While its exact function in the cell is still unknown, several reports have shown evidence of its implication in the cell cycle as well as in gene expression, translation, splicing and mRNA nuclear export [34,35,50,51,52,53]. This protein was drawn to our particular attention not only because its incorporation into mature virions was shown to influence HSV-1 infectivity but also because of its known incorporation into the mature virions of herpesviruses HCMV [15] and PRV [17] and its involvement in the proliferation cycle of some very different families of viruses [34,36,37,38,40]. To validate independently the relevance of DDX3X implication in HSV-1 replication cycle, we used the DDX3X temperature-sensitive BHK21-derived cell line ET24, whereby DDX3X is inactive at 39,5°C but functional at 34°C [54]. Infection of the thermosensitive ET24 and parental BHK21 cell lines with HSV-1 showed that viral output was strongly reduced at the non-permissive temperature in the ET24 cell line (Figure 6B). Given the incubation of ET24 at the non-permissive temperature has been reported to arrest the cells in the G1 phase [52,55], we asked whether the cells remained metabolically active at the permissive and non-permissive temperatures. The analysis with alamarBlue assay, which monitors the redox potential of the cell, indicated that the cells remained active and healthy after 48 hour incubation at the non-permissive temperature. Importantly, this time corresponded to the moment where supernatant were harvested and viral output titrated (Figure 6A). Similar results were independently obtained using the ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega) that monitors three other cellular processes, namely membrane integrity, the activity of cytoplasmic proteases and activation of the apoptotic pathway (data not shown). This was also true for 143B cells treated with siRNAs targeting DDX3X. Furthermore, no visual evidence for apoptosis or necrosis was detected by optical microscopy (data not shown). Consequently, cell arrest or viability were unlikely an issue. Taken together, these results ruled out possible nonspecific or off-targets effects of the siRNA and confirmed that DDX3X is indeed a modulator of HSV-1 life cycle.



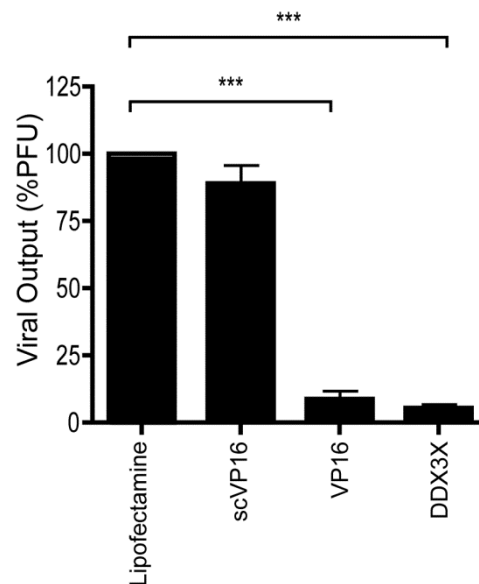
**Figure 6. DDX3X is necessary for HSV-**

**1 replication.** A) Equal number of DDX3X thermosensitive ET24 and parental BHK21 cells were incubated for 48 hours at the permissive (34°C) or non-permissive (39.5°C) temperature and cellular viability and metabolism activity was assessed using alamarBlue. B) Both cell lines were incubated at 34°C or 39.5°C for 24 hours prior to infection and infected for an additional 24 hours at that same temperature. Afterwards, supernatants were collected and titrated on Vero cells. Titers were normalized to the mean value obtained with samples infected at 34°C and represent the averages of two independent experiments, each titrated in duplicates. The error bars represent the standard deviations to the means.

### Inhibition of DDX3X reduces HSV-1 intracellular yields and viral protein expression

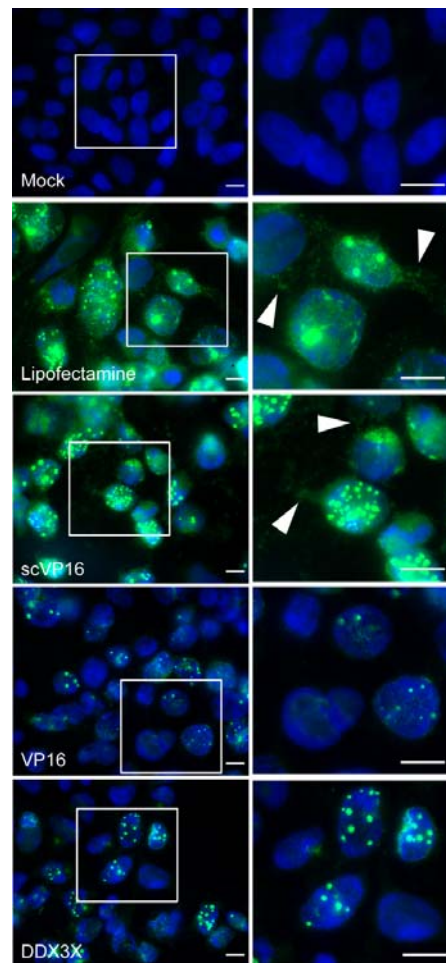
The present data hint at the importance of several of the host proteins incorporated in HSV-1 mature virions. We also orthogonally confirmed that one of them, DDX3X, regulates viral proliferation in thermosensitive cells. However, it was unclear what stage of the viral life cycle is affected by the absence of this cellular protein. Several experiments were performed to address this point. First intracellular virions were harvested from DDX3X or control VP16 and scVP16 siRNA pretreated cells and titrated on Vero cells. Figure 7 shows that while the amount of infectious virions in Lipofectamine- and scVP16-treated cells was substantial, intracellular particle forming units were significantly reduced in cells treated with the siRNA against VP16. Similarly DDX3X depletion also reduced intracellular viral yields, indicating that the protein may be needed for capsid nuclear egress or at an early step of the viral life cycle. This was consequently examined by fluorescence microscopy. As expected, 18 hours post infection (hpi), the virus was present in the nucleus, cytoplasm and cell surface of infected cells transfected with Lipofectamine or the scVP16 siRNA (Figure 8). In contrast, in cells treated with siRNA targeting either VP16 or DDX3X, viral particles were present but retained in the nucleus. In addition, they were significantly fewer fluorescent speckles hinting that DDX3X may act before or during

nucleocapsid assembly. We next monitored the expression of the viral proteins in the presence or absence of DDX3X. Lysates prepared from cells pretreated with Lipofectamine, scVP16 siRNA and siRNA targeting VP16 or DDX3X and infected with HSV-1 were harvested at various times and analyzed by Western blotting. As expected, siRNA against DDX3X or VP16 resulted in a marked reduction of their respective expression (Figure 9). A pan polyclonal serum against HSV-1 particles [13] further revealed a substantial reduction of some viral proteins in cells treated with siRNA targeting VP16 or DDX3X at 24 hpi, in agreement with our observations that DDX3X-depleted cells produce fewer virions. This is also in line with reports that a VP16-null virus arrests translation midway through the infection cycle [6,56]. These data further suggested that viral entry took place normally in both cases since many proteins were unaffected by the siRNAs. Interestingly, the expression level of the immediate-early ICP0 and ICP4 transactivators were strongly reduced in absence of DDX3X at 3 hpi, which is consistent with the hypothesis that DDX3X acts at an early time post infection. Unexpectedly, the expression of ICP4 reached normal levels by 24 hpi, while that of ICP0 was still partly hindered at that time. Oddly, VP16 and VP5 levels appeared normal at all times. Altogether, this suggested a complex scenario whereby DDX3X possibly delayed the expression of ICP0 and ICP4 at early times without an impact of the late VP5 or VP16 viral proteins.



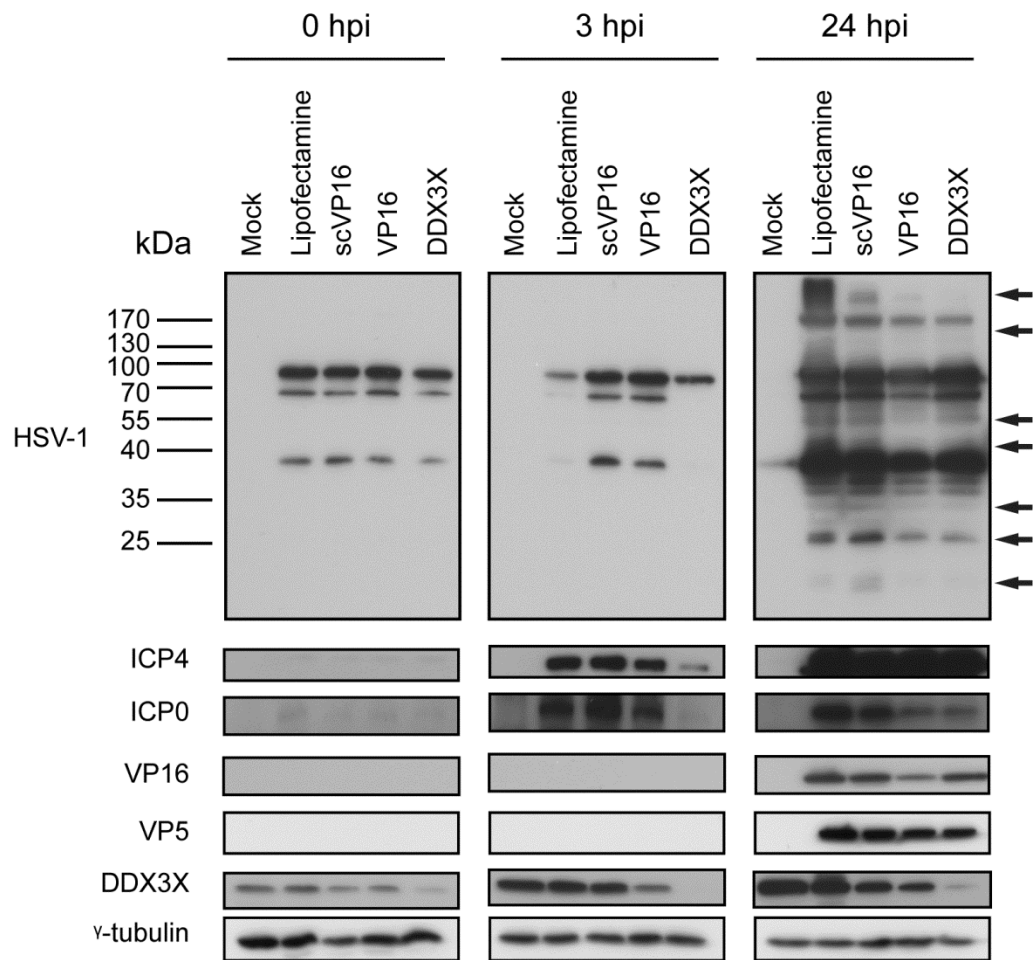
**Figure 7. Impact of DDX3X knockdown on intracellular virions.** *143B cells were transfected with siRNA targeting DDX3X or VP16 and infected with K26GFP as before. Cells were collected*

and lysed and viruses were titrated on Vero cells. The error bars show the standard deviations to the means of two independent experiments. Bilateral Student's T-tests were performed to detect significant hits compared to the Lipofectamine only control (\*:  $p < 0.05$ ).



**Figure 8. Inhibition of DDX3X reduced the amount of viral particles in infected cells.**

143B cells were mock treated or transfected with Lipofectamine, scVP16 siRNA or siRNAs against DDX3X or VP16 as indicated and infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5 for 18 hours. Cells were fixed and the nucleistained with Hoechst 33342. Right panels are enlargements of the squared sections in the left panels and arrows indicate cytoplasmic viral particles. Scale bars: 10  $\mu$ m.



**Figure 9. Impact of the inhibition of DDX3X on HSV-1 protein expression.** *143B cells were transfected with Lipofectamine, scVP16 or siRNAs against VP16 or DDX3X as before and mock infected or infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. Cells were collected at 0, 3, and 24 hpi and analyzed by Western blotting for the expression of HSV-1 proteins, VP16 and DDX3X.  $\gamma$ -Tubulin levels were used as loading controls. Arrows indicates important diminution of protein expression in DDX3X siRNA-transfected cells at 24 hpi compared to the Lipofectamine-treated sample.*

## DISCUSSION

Viruses are obligatory intracellular parasites that depend on many cellular functions to complete their life cycle. These interactions are complex and often poorly understood. While the contribution of host proteins to HSV-1 has been partially elucidated, genomic screens with other viruses suggest this may only be the tip of the iceberg [57,58,59,60,61]. Recently, we reported the detection of up to 49 distinct cellular proteins within mature extracellular HSV-1 virions [13], adding an additional layer of complexity to the already complex comprehension of host-pathogen interactions. Since some of these proteins may play pivotal roles during the viral life cycle, they constitute prime targets to identify and characterize novel host-pathogen interactions in the context of HSV-1.

The novel siRNA assay reported in this study is sensitive, rapid, linear and correlates with classical plaque assays (Figures 2 to 4). The data demonstrate by fluorometry and plaque assays that at least 15 of the proteins tested are involved in the HSV-1 replication cycle in cell culture (Figures 3 and 4). We could even single out specific protein isoforms that affect viral proliferation. For instance, inhibition of Arf1 significantly reduced viral production while the inhibition of other Arf isoforms failed to do so, hinting at the specificity of the assay and the lack of pleiotropic effect of the siRNA (Figure 3). Moreover, the absence of phenotype by isoforms not expressed in the 143B cell line used in this study, like Rab6B and Rab6C [62], further confirms the specificity and reliability of the assay. The lack of impact of the siRNA with significant cytotoxic effects such as KRT1 and RAB5C (Figure 3) and the very limited overlap observed when the transfected cells were infected with Adenovirus also supports the notion that the above targets are specifically involved in HSV-1 replication and not merely the results of less viable or unhealthy cells. This is strongly correlated by experiments depleting these host proteins from the virions but not the cell, yet still having an impact on viral yields. We therefore conclude that these molecules are specifically involved in the viral life cycle and that their deletion by siRNA in the cells is unlikely a pleiotropic effect.

The limited cytotoxicity of the siRNA is somewhat surprising even though it is consistent with the observations from other genomic screens [60,63]. Only the inhibition of ubiquitin C, which did perturb HSV-1 output, correlated with high siRNA-associated cytotoxicity and was therefore not considered further, though it may still be relevant for the



HSV-1 replication cycle. This generally low cytotoxicity for other targets is likely the result of our particular experimental setup. It may for instance be due to an imperfect inhibition of the targeted protein and the functional redundancy between many cellular proteins. For instance, while the silencing of individual Arf isoforms caused little toxicity, the simultaneous inhibition of the four isoforms was more lethal (Figure 3). Taken together, these results strongly implicate in the HSV-1 life cycle at least 15 of the host proteins identified by mass spectrometry in mature extracellular virions.

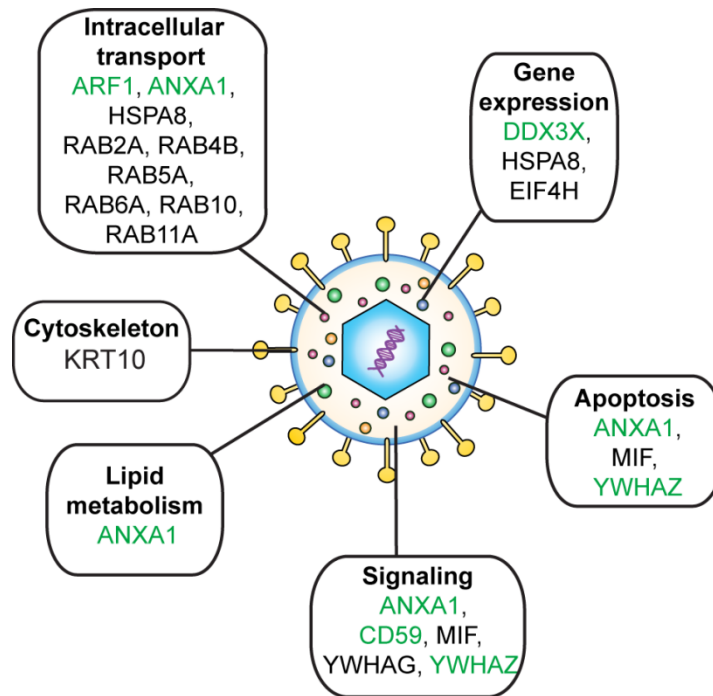
It is important to note that the actual number of positive hits is likely higher than reported in the present study. Missed targets could include cellular proteins with long half-lives unperturbed by the siRNA, proteins that may be complemented by their virion-associated counterpart as well as proteins with more subtle impacts on the virus. Furthermore, the screen only considers host proteins involved in HSV-1 replication in tissue culture and may exclude some virulence factors and immune or latency-related proteins. In this context, the absence of phenotype upon depleting cyclophilin A, one of the proteins most commonly found into herpesvirions and other families of viruses [15,21,25,64,65,66], is not surprising but consistent with its implication in immunosuppression [67]. Finally, the screen initially measured GFP output and quantified total viral particle release rather than infectious virions as determined by plaque assays. It is thus possible that some siRNA reduced the production of infectious viruses without affecting the total amount of viral particles. Despite these limitations, the positive rate from this study is very high at 31% (i.e. 15/49). For comparison, genome-wide siRNA screens for HIV, influenza and West Nile virus have positive rates below 1.5% [57,58,59,60,61,68]. The data thus constitute a strong validation of the relevance of our strategy to unmask novel cellular players by combining proteomics [13] and a targeted siRNA screen (this study). Furthermore, this study and those of others [5,11,69,70,71,72] highlight the potency of siRNA as a useful tool to study HSV-1 host-pathogen interactions, despite of the ability of the virus to downregulate RNA-induced gene silencing [73].

The current GFP-based assay is less sensitive than traditional plaque assays but is much better suited to screen large numbers of targets. For example, Arf1 depletion roughly inhibited viral yields by 75% by fluorometry but by more than a log by plaque assays (figures 3, 4). While it is clear that the reductions are not as spectacular as when some viral genes are deleted. However, important differences have to be considered when analyzing

the impact of host proteins instead of viral proteins. First, host proteins are often complemented by another gene copy, another isoform, a parallel pathway or other means, which implies that smaller effects upon depletion are not surprising. This is even true for some HSV-1 genes, for which multiple deletions are required to analyze their role. Second, viral deletion mutants are more homogenous through multiple plaque purification or bacmid technology. This is not the case for siRNA because protein expression is often not completely inhibited, even when using siRNA pools. Likewise, not all cells are transfected with the siRNA, allowing additional viruses to be produced. Furthermore, some host proteins may have longer half-lives and the residual protein expression following the siRNA treatment may suffice to support some viral replication. Third, cellular proteins finely exert their actions with impacts typically in the lower fold range (2-4 folds) rather than logs (10-100 folds). Forth, a study by Hill and colleagues [74] shows that HSV-1 itself modulates the expression of 3123 host proteins by only 1.4 to 14.2 folds, changes that are presumably beneficial for the virus. Finally, our results are in the same range (i.e. less than a log) observed by others in recent studies analyzing the impact of cellular proteins on HSV-1 proliferation [75,76,77,78]. Multi-log inhibitions were therefore not expected in the present study. SiRNA screens have been most useful in the past and are frequently used to study host-pathogen interactions. The present data suggest that many of the tested proteins are indeed modulators of viral production.

The positive hits found in this study identified several potential players in the HSV-1 life cycle. Many of these proteins are involved in pathways that are most likely important for the infection process (Figure 10). Among them, several Rab GTPases and other intracellular transport components as well as proteins involved in signal transduction were identified, some of which have already been proven necessary for viral production. For instance, it has recently been shown that Rab6A, is necessary for the cellular trafficking of HCMV viral protein pp150 and efficient virus assembly [77], while Rab11 modulates the intracellular transport of influenza genome to the plasma membrane [79]. Similarly, Rab1 and Rab43 have been implicated in HSV-1 secondary envelopment [75]. It is thus highly possible that some of the proteins identified in the present study are involved in the numerous transport events occurring in the course of HSV-1 infection. The present screen is therefore very useful to pursue novel host-pathogen interactions in the context of HSV-1 infections. Moreover, 6 of the 15 proteins; 14-3-3  $\zeta/\delta$  (YWHAZ), Arf1 (ARF1), DDX3X,

eIF4H, keratin 10 (KRT10) and CD59 have previously been found in HCMV, KSHV and/or PRV viral particles in addition to HSV-1 [15,16,17,25], suggesting that they might have a common roles throughout the herpesvirus family.



**Figure 10. Cellular functions of virion-incorporated host proteins.** *Several of the positive hits of our functional screen are implicated in pathways that are most likely relevant for the virus. While all of them were found in HSV-1 mature viral particles, many of these proteins (in green) have also been found incorporated into other herpesviruses, suggesting a common role for these proteins throughout the family [15,16,17,25].*

Many studies have reported the incorporation of host proteins within mature virions but very few have addressed the significance of the incorporated fraction of cellular proteins in viral infectivity. To verify the importance of the pool of host proteins present in the extracellular virion, we depleted these proteins from virions by RNA interference and used them to reinfect normal cells. This method enabled us to identify for the first time 8 proteins whose absence from the virions reduced viral production by at least 50% (Table 2), hence highlighting the close relationship between the virus and its host. In contrast, the depletion of some host proteins (ex: Arf1, eIF4H and Rab11A) in the virions caused little or no impact on viral production. While Arf1 and Rab11A are presumably acquired at the TGN during HSV-1 final assembly and may thus not be important to reinfect cells, the

results obtained with eIF4H-depleted virions are surprising considering that this protein is known to interact with the viral protein Vhs at early times after entry [5]. While it is possible that this protein is incorporated because of its abundance and/or localization at assembly sites, it may be that the virion-incorporated form of eIF4H is not functional and must be activated. It has indeed been reported that binding to other factors such as the cap-binding complex eIF4F, which was not detected in the virions [13], is also needed for the Vhs-induced degradation of mRNA [80]. Consequently, the virion-associated pool of eIF4H alone may not be sufficient to perform its role in HSV-1 infection. Another important aspect relates to the particular cell line used. The present study was performed in 143B cells and it is likely that the pool of host proteins incorporated in mature virions varies among cell types. Though difficult to perform, a similar study of host proteins in virions produced on neuronal cells would be particularly interesting.

As proof of concept of the importance of virions associated host proteins, we analyzed DDX3X in greater details. This protein clearly modulated HSV-1 viral output in both the siRNA screen and classical plaque assays (Figures 3 and 4). This was further orthogonally confirmed using the DDX3X temperature-sensitive cell line ET24, where HSV-1 production was drastically diminished at the non-permissive temperature (Figure 5). Moreover, the virion-incorporated fraction of DDX3X was shown to impact HSV-1 infectivity (Table 2). A substantial diminution of intracellular viral particles was also observed upon the depletion of DDX3X (Figure 8). Upon closer scrutiny, we observed a down regulation of ICP0 and ICP4 expression at early times in the absence of DDX3X, but of ICP0 only at late times (Figure 9). This, as well as our observation that the virion-incorporated DDX3X facilitates HSV-1 infection, is consistent with a role for DDX3X early in the infection. Since expression of later classes of viral proteins are dependent upon the expression of immediate-early proteins, the reduced levels of some HSV-1 proteins observed with the pan HSV-1 antibody at later times makes good sense (Figure 9). This unexpectedly contrasted with the normal levels of the late VP5 and VP16 proteins, which at the very least indicated that viral entry occurred and that some replication did ensue. This puzzling scenario remains a mystery and suggests that some other direct or indirect targets of DDX3X must exist. Their identification will be essential to uncover the exact mechanism of action of DDX3X. Interestingly, this host protein interacts with the vaccinia K7 protein and HCV core protein, resulting in an inhibition of interferon-beta production

[36,37,81], while the incorporation of DDX3 into HBV nucleocapsids causes an inhibition of viral replication by blocking reverse transcription [40] but neither of these mechanisms are likely involved in this study. In contrast, DDX3X associates with export messenger ribonucleoproteins and binds to the cellular export factor Crm1 to enable the transport of HIV mRNAs from the nucleus to the cytoplasm [34] [53]. It also interacts with the Tip-associated Protein (TAP/NXF1) and translation initiation complexes to promote the translation of certain types of mRNAs. Since some HSV-1 mRNAs may be sorted through the Crm1 pathway and that the viral protein ICP27 interacts with TAP/NXF1 [82,83,84,85], it would be interesting to determine if DDX3X is involved in these processes.

The present study highlights the very close relationship between HSV-1 and its host. However, the full extent of host-pathogen interactions between HSV-1 and the cell remains elusive at the moment. Our approach constitutes an innovative and powerful strategy that has already proved useful to identify several potential novel cellular proteins that modulate the HSV-1 life cycle. The characterization of their functions at the molecular level is therefore of the upmost interest. Since all of these proteins have previously been detected in mature extracellular HSV-1 virions [13], they constitute a new class of proteins to study as potential therapeutic targets. In particular, it exposes DDX3X as a potential therapeutic target against a broad range of human viruses.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** 143B tk<sup>-</sup>, Vero, ET24 and BHK21 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, HyClone) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen) in 5% CO<sub>2</sub>. 143B cells were also supplemented with 15µg/ml 5-bromo-2 deoxyuridine (BrdU; Sigma) except prior to transfection and infection. The ET24 thermosensitive and parental BHK21 cell lines (a kind gift from Dr Takeshi Sekiguchi) [54] were maintained at the permissive temperature of 34°C unless mentioned otherwise. The previously described HSV-1 K26GFP mutant (strain KOS) has been provided by Prashant Desai [41] and was propagated on BHK cells and titrated on Vero cells while the previously described. Finally, the pIX-ΔE3 EGFP human Adenovirus type 5 [86] was propagated on 293 cells.

**Antibodies.** Primary antibodies were provided and diluted as follows: the anti-DDX3 R648 (1:1000) was a kind gift from Dr A. Patel [38], while anti-VP16 (1:1000) and the Remus V anti-HSV-1 antibodies were kindly provided by Dr H. Browne and Dr B. Sodeik respectively. Other antibodies were purchased from commercial sources, including anti-VP5 (1:2000; Cedarlane), anti-ICP0 (1:1000; Abcam), anti-ICP4 (1:800; Abcam) and anti  $\alpha$ -tubulin (1:1000; Sigma-Aldrich). Goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch.

**Inhibition of HSV-1 life cycle by drugs.** 143B cells were seeded overnight in a 24-well plate at a  $2.5 \times 10^5$  cells/well density. Cells were then mock treated or infected at a MOI of 5 with HSV-1 K26GFP. After absorption, cells were washed twice in PBS and fed complete DMEM containing MG132 (25 µM, Calbiochem), phosphonoacetic acid (PAA; 400 µg/ml; Sigma-Aldrich) or Brefeldin A (BFA; 5µg/ml; Sigma-Aldrich). In the case of cells treated with MG132, the drug was first added 15 minutes prior to infection and during absorption in order to prevent the transport of capsids to the nucleus. The infection proceeded for 24 hours at which time supernatants were collected and viral output measured as below (siRNA screen).

**siRNA screen.** siGENOME SMARTpool and select ON-TARGETplus siRNAs targeting the human proteins previously identified in mature extracellular virions [13] were purchased from Dharmacon (Table 1; Thermo Fisher Scientific). The published siRNA targeting the HSV-1 protein VP16 was used as a positive control [11] and a scrambled sequence of the VP16 siRNA was used as a negative control. Twenty-four hours prior to transfection, 143B cells were seeded in 24-well plates at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/well. siRNA transfections were then performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2  $\mu$ l/well of Lipofectamine 2000 was diluted in Opti-MEM (Invitrogen) and incubated for 5 minutes before its incorporation into 100 nM/well of siRNA diluted in Opti-MEM or only Opti-MEM as control. The mixes were allowed to incubate 20 minutes during which time the cells' medium was replaced by Opti-MEM. The siRNA were then added to the cells, incubated for 5 hours before the medium was replaced by DMEM (with 10% FCS and L-glutamine) and incubated for 43 more hours for a total of 48 hours of transfection. At that point, cells were mock treated or infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. After a one hour absorption period, cells were washed twice in PBS, completed DMEM was added to the wells and the cells were incubated for a further 24 hours. Cells and supernatants were then collected. The viruses in supernatants were inactivated using formaldehyde (Sigma), concentrated 2 hours at  $18000 \times g$  and the resulting viral pellets resuspended in 100  $\mu$ l of phosphate-buffered saline (PBS) pH 8. They were then transferred into a 96-well black bottom  $\mu$ Clear plate (Greiner Bio-One) and their fluorescence was measured using a Gemini EM spectrofluorometer and SoftMax Pro 4 (Molecular Devices). Each experiment was performed in triplicates and repeated three times.

**Viability assays.** 143B cells were mock treated with Lipofectamine alone or transfected with siRNA for 44 hours. Cells were washed twice and the medium replaced. For ET24 cells, equal quantities of ET24 and the parental cell line BHK21 were seeded in 6-well plates and incubated for 44 hours at 34°C or 39,5°C. AlamarBlue (AbD Serotec) or the ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega) were subsequently added to the cells or to DMEM medium as a control according to the manufacturer's instruction. The cells were further incubated in accordance with the manufacturers' instructions before viability was measured by spectrofluorometry and apoptosis by luminescence.

**siRNA screen with adenovirus.** 143B cells transfected for 48 hours with Lipofectamine alone or siRNA as described above were mock treated or infected with the adenovirus pIX- $\Delta$ E3 EGFP at an equal MOI for 48 hours. Supernatant were collected and viral DNA was purified using the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. qPCR was performed with a Rotor-Gene 6000 (Corbett) using the FastStart SYBR Green Master (Roche Diagnostics). For the amplification, a primer pairs specific for EGFP was used: forward, 5' ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC 3'; EGFP reverse, 5' AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG 3'. The data are expressed in relative genome copy compared to the lipofectamine treated control and were pooled from three independent experiments.

**Western blotting.** To verify the efficacy of the siRNA reagents on the expression of the targeted proteins or the impact of the deletion on other proteins, 143B cells were transfected for 48 hours with Lipofectamine alone or siRNAs then were mock treated or infected with K26GFP at a MOI of 5 for 0, 3 or 24 hours. Supernatants were concentrated for 2 hours at  $18\,000 \times g$  and resuspended in 10  $\mu$ l of PBS while cells were then collected, washed in PBS and lysed by 3 cycles of rapid freeze-thaw. Unless specified otherwise, equal amount of proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [13][12][12]. For Western blotting, the HSV-1 Remus V polyclonal antibody as well as antibodies against the viral proteins ICP0, ICP4, VP5 and VP16 or the human DDX3X, ARF1 and  $\alpha$ -tubulin proteins were used. When indicated, protein expression levels were quantified using ImageJ (version 1.45b).

**Plaque assays.** 143B cells were transfected with siRNAs and infected with HSV-1 K26GFP as described above. Supernatants or cell lysates were titrated on Vero cells as described before [42].

**Analysis of siRNA transfected cells by fluorescence microscopy.** 143B cells were transfected as described previously and infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5 for 18 hours. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde in PBS, washed with PBS and treated with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS. Cells were mounted on glass slides in Mowiol containing 0.1 g/ml



Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Fluorescence microscopy was performed with an Axiophot wide-field fluorescence microscope (Zeiss) equipped with filters and a Retiga 1300 camera (Q Imaging). The images were acquired with Northern Eclipse imaging software (Empix Imaging) and processed with Photoshop CS5 (Adobe).

**Importance of the pool of cellular proteins incorporated in the virions.** 143B cells were transfected as in the siRNA screen or with the transfection agent only for 48 hours. Cells were then infected for a further 24 hours with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5. Supernatants were collected and titrated on Vero cells. Fresh 143B cells were either mock treated or transfected with the siRNA for 48 hours. They were then infected with the titrated supernatants from the previous round of transfection/infection at an MOI of 0.1 for 48 hours. The supernatants from this second round of transfection/infection were collected and titrated on Vero cells.

**Inhibition of HSV-1 life cycle in thermosensitive cell line.** Thermosensitive ET24 and parental BHK21 cells were plated in 6-well plates and incubated at the permissive temperature of 34°C or the non-permissive temperature of 39.5°C for 24 hours. The cells were then mock treated or infected with HSV-1 K26GFP at a MOI of 5 at 34°C or 39.5°C. Cells and supernatants were collected at 24 hpi and HSV-1 production titrated by plaque assays.

**Statistical analysis.** Fluorescence and virus titers were normalized to the values obtained for the controls as indicated in the figure legends. Bilateral Student T tests were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Drs Prashant Desai, Arwind Patel, Takeshi Sekiguchi, Helena Browne and Beate Sodeik for antibodies, viruses and cell lines. We would also like to thank members of the laboratory for their critical reading of the manuscript and suggestions. This work was funded by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82921). Y. Y. was supported by a Canada Frederick Banting and Charles Best studentship from the CIHR.

## REFERENCES

1. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, et al. (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 13: 2795-2809.
2. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136: 1007-1021.
3. Luxton GW, Haverlock S, Collier KE, Antinone SE, Pincetic A, et al. (2005) Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5832-5837.
4. Radtke K, Kienek D, Wolfstein A, Michael K, Steffen W, et al. (2010) Plus- and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures. *PLoS Pathog* 6: e1000991.
5. Sarma N, Agarwal D, Shiflett LA, Read GS (2008) Small interfering RNAs that deplete the cellular translation factor eIF4H impede mRNA degradation by the virion host shutoff protein of herpes simplex virus. *J Virol* 82: 6600-6609.
6. Lam Q, Smibert CA, Koop KE, Lavery C, Capone JP, et al. (1996) Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *EMBO J* 15: 2575-2581.
7. Everett RD (2000) ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* 22: 761-770.
8. Halford WP, Kemp CD, Isler JA, Davido DJ, Schaffer PA (2001) ICP0, ICP4, or VP16 expressed from adenovirus vectors induces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in primary cultures of latently infected trigeminal ganglion cells. *J Virol* 75: 6143-6153.
9. Hancock MH, Corcoran JA, Smiley JR (2006) Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology* 352: 237-252.
10. Ellison KS, Maranchuk RA, Mottet KL, Smiley JR (2005) Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27. *J Virol* 79: 4120-4131.

11. Zhang YQ, Lai W, Li H, Li G (2008) Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA. *Clin Exp Dermatol* 33: 56-61.
12. Loret S, Lippe R (2011) Biochemical Analysis of ICP0, ICP4, UL7 and UL23 Incorporated into Extracellular Herpes Simplex Type 1 Virions. *J Gen Virol*, In press.
13. Loret S, Guay G, Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 82: 8605-8618.
14. Bechtel JT, Winant RC, Ganem D (2005) Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 79: 4952-4964.
15. Varum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, et al. (2004) Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78: 10960-10966.
16. Spear G, Lurain N, Parker C, Ghassemi M, Payne G, et al. (1995) Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *The Journal of Immunology* 155: 4376-4381.
17. Kramer T, Greco TM, Enquist LW, Cristea IM (2011) Proteomic Characterization of Pseudorabies Virus Extracellular Virions. *J Virol* 85: 6427-6441.
18. Cantin R, Methot S, Tremblay MJ (2005) Plunder and Stowaways: Incorporation of Cellular Proteins by Enveloped Viruses. *J Virol* 79: 6577-6587.
19. Ott DE (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Reviews in Medical Virology* 18: 159-175.
20. Gurer C, Cimorelli A, Luban J (2002) Specific Incorporation of Heat Shock Protein 70 Family Members into Primate Lentiviral Virions. *J Virol* 76: 4666-4670.
21. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P (2008) Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. *PLoS Pathog* 4: e1000085.
22. Moerdyk-Schauwecker M, Hwang SI, Grdzlishvili VZ (2009) Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach. *Virol J* 6: 166.

23. Krauss O, Hollinshead R, Hollinshead M, Smith GL (2002) An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. *J Gen Virol* 83: 2347-2359.
24. Baldick CJ, Jr., Shenk T (1996) Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* 70: 6097-6105.
25. Zhu FX, Chong JM, Wu L, Yuan Y (2005) Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 79: 800-811.
26. Del Rio T, Ch'ng TH, Flood EA, Gross SP, Enquist LW (2005) Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* 79: 3903-3919.
27. Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weicksel S, Cahir-McFarland E, et al. (2004) Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16286-16291.
28. Dry I, Haig DM, Inglis NF, Imrie L, Stewart JP, et al. (2008) Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol* 82: 5390-5397.
29. Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, et al. (2004) Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* 78: 11187-11197.
30. Lodish HF, Porter M (1980) Specific incorporation of host cell surface proteins into budding vesicular stomatitis virus particles. *Cell* 19: 161-169.
31. Zhang C, Xue C, Li Y, Kong Q, Ren X, et al. (2010) Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomics analysis. *Virology Journal* 7: 242.
32. Sokolskaja E, Sayah DM, Luban J (2004) Target Cell Cyclophilin A Modulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity. *J Virol* 78: 12800-12808.
33. Cullen BR (2005) Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* 433: 26-27.
34. Yedavalli VSRK, Neuveut C, Chi Y-h, Kleiman L, Jeang K-T (2004) Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* 119: 381-392.
35. Kwong AD, Rao BG, Jeang KT (2005) Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat Rev Drug Discov* 4: 845-853.

36. Kalverda AP, Thompson GS, Vogel A, Schroder M, Bowie AG, et al. (2009) Poxvirus K7 protein adopts a Bcl-2 fold: biochemical mapping of its interactions with human DEAD box RNA helicase DDX3. *J Mol Biol* 385: 843-853.
37. Schroder M, Baran M, Bowie AG (2008) Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J* 27: 2147-2157.
38. Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, et al. (2010) Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol* 91: 122-132.
39. Chang PC, Chi CW, Chau GY, Li FY, Tsai YH, et al. (2006) DDX3, a DEAD box RNA helicase, is deregulated in hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma and is involved in cell growth control. *Oncogene* 25: 1991-2003.
40. Wang H, Kim S, Ryu WS (2009) DDX3 DEAD-Box RNA helicase inhibits hepatitis B virus reverse transcription by incorporation into nucleocapsids. *J Virol* 83: 5815-5824.
41. Desai P, Person S (1998) Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* 72: 7563-7568.
42. Turcotte S, Letellier J, Lippe R (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79: 8847-8860.
43. Campadelli G, Brandimarti R, Di Lazzaro C, Ward PL, Roizman B, et al. (1993) Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2798-2802.
44. Delboy MG, Roller DG, Nicola AV (2008) Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J Virol* 82: 3381-3390.
45. Hay J, Brown SM, Jamieson AT, Rixon FJ, Moss H, et al. (1977) The effect of phosphonoacetic acid on herpes viruses. *J Antimicrob Chemother* 3 Suppl A: 63-70.
46. Dasgupta A, Wilson DW (2001) Evaluation of the primary effect of brefeldin A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J Gen Virol* 82: 1561-1567.
47. Cheung P, Banfield BW, Tufaro F (1991) Brefeldin A arrests the maturation and egress of herpes simplex virus particles during infection. *J Virol* 65: 1893-1904.

48. Eckstein A, Grossl T, Geisler A, Wang X, Pinkert S, et al. (2010) Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Res* 88: 86-94.
49. Weinheimer SP, Boyd BA, Durham SK, Resnick JL, O'Boyle DR, 2nd (1992) Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 66: 258-269.
50. Tarn WY, Chang TH (2009) The current understanding of Ded1p/DDX3 homologs from yeast to human. *RNA Biol* 6: 17-20.
51. Schroder M (2010) Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation. *Biochem Pharmacol* 79: 297-306.
52. Lai MC, Chang WC, Shieh SY, Tarn WY (2010) DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1. *Mol Cell Biol* 30: 5444-5453.
53. Lai MC, Lee YH, Tarn WY (2008) The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell* 19: 3847-3858.
54. Sekiguchi T, Iida H, Fukumura J, Nishimoto T (2004) Human DDX3Y, the Y-encoded isoform of RNA helicase DDX3, rescues a hamster temperature-sensitive ET24 mutant cell line with a DDX3X mutation. *Exp Cell Res* 300: 213-222.
55. Fukumura J, Noguchi E, Sekiguchi T, Nishimoto T (2003) A temperature-sensitive mutant of the mammalian RNA helicase, DEAD-BOX X isoform, DBX, defective in the transition from G1 to S phase. *J Biochem* 134: 71-82.
56. Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* 74: 6287-6299.
57. Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, et al. (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463: 813-817.
58. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, et al. (2008) Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319: 921-926.

59. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner K-P, Artarini A, et al. (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463: 818-822.
60. König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GMC, et al. (2008) Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication. *Cell* 135: 49-60.
61. Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, et al. (2008) RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455: 242-245.
62. Young J, MÈnÈtrey J, Goud B (2010) RAB6C Is a Retrogene that Encodes a Centrosomal Protein Involved in Cell Cycle Progression. *Journal of Molecular Biology* 397: 69-88.
63. Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim S-S, Sakamoto N, et al. (2009) A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication. *Cell host & microbe* 5: 298-307.
64. Towers G (2007) The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 4: 40.
65. Hatziioannou T, Perez-Caballero D, Cowan S, Bieniasz P (2005) Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J Virol* 79: 176 - 183.
66. Bose S, Mathur M, Bates P, Joshi N, Banerjee AK (2003) Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *J Gen Virol* 84: 1687-1699.
67. Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J (2005) Cyclophilin A-Deficient Mice Are Resistant to Immunosuppression by Cyclosporine. *The Journal of Immunology* 174: 6030-6038.
68. Clemente R, Sisman E, Aza-Blanc P, de la Torre JC (2010) Identification of host factors involved in borna disease virus cell entry through a small interfering RNA functional genetic screen. *J Virol* 84: 3562-3575.
69. Bhuyan PK, Kariko K, Capodici J, Lubinski J, Hook LM, et al. (2004) Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *J Virol* 78: 10276-10281.



70. Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, Kobayash N, Qin-Chang Z, et al. (2008) Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol* 153: 1401-1406.
71. Durand LO, Roizman B (2008) Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1. *J Virol* 82: 10591-10599.
72. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, et al. (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 10: 480-487.
73. Wu Z, Zhu Y, Bisaro DM, Parris DS (2009) Herpes simplex virus type 1 suppresses RNA-induced gene silencing in mammalian cells. *J Virol* 83: 6652-6663.
74. Clement C, Popp MP, Bloom DC, Schultz G, Liu L, et al. (2008) Microarray analysis of host gene expression for comparison between naive and HSV-1 latent rabbit trigeminal ganglia. *Molecular Vision* 14: 1209-1221.
75. Zenner HL, Yoshimura S, Barr FA, Crump CM (2011) Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment. *J Virol* 85: 8012-8021.
76. Maric M, Shao J, Ryan RJ, Wong CS, Gonzalez-Alegre P, et al. (2011) A functional role for TorsinA in herpes simplex virus 1 nuclear egress. *J Virol* 85: 9667-9679.
77. Indran SV, Britt WJ (2011) A Role for the Small GTPase Rab6 in Assembly of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 85: 5213-5219.
78. Karasneh GA, Ali M, Shukla D (2011) An important role for syndecan-1 in herpes simplex virus type-1 induced cell-to-cell fusion and virus spread. *PLoS ONE* 6: e25252.
79. Eisfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, Neumann G, Kawaoka Y (2011) RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane. *J Virol* 85: 6117-6126.
80. Page HG, Read GS (2010) The Virion Host Shutoff Endonuclease (UL41) of Herpes Simplex Virus Interacts with the Cellular Cap-Binding Complex eIF4F. *J Virol* 84: 6886-6890.
81. Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, et al. (2010) Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *PLoS ONE* 5: e14258.

82. Chen I-HB, Li L, Silva L, Sandri-Goldin RM (2005) ICP27 Recruits Aly/REF but Not TAP/NXF1 to Herpes Simplex Virus Type 1 Transcription Sites although TAP/NXF1 Is Required for ICP27 Export. *J Virol* 79: 3949-3961.
83. Verhagen J, Donnelly M, Elliott G (2006) Characterization of a Novel Transferable CRM-1-Independent Nuclear Export Signal in a Herpesvirus Tegument Protein That Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm. *J Virol* 80: 10021-10035.
84. Soliman TM, Silverstein SJ (2000) Herpesvirus mRNAs Are Sorted for Export via Crm1-Dependent and -Independent Pathways. *J Virol* 74: 2814-2825.
85. Hernandez FP, Sandri-Goldin RM (2010) Head-to-tail intramolecular interaction of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is important for its interaction with cellular mRNA export receptor TAP/NXF1. *MBio* 1: e00268-00210.
86. Le LP, Everts M, Dmitriev IP, Davydova JG, Yamamoto M, et al. (2004) Fluorescently labeled adenovirus with pIX-EGFP for vector detection. *Mol Imaging* 3: 105-116.